



**ALEXANDRE JOSÉ  
FERREIRA VALA**

**BIGSEED4FILMS: APLICAÇÃO DO CAROÇO DE  
ABACATE NO DESENVOLVIMENTO DE  
BIOPLÁSTICOS**



**ALEXANDRE JOSÉ  
FERREIRA VALA**

**BIGSEED4FILMS: APLICAÇÃO DO CAROÇO DE  
ABACATE NO DESENVOLVIMENTO DE  
BIOPLÁSTICOS**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia Alimentar, realizada sob a orientação científica da Doutora Idalina José Monteiro Gonçalves, Investigadora Júnior do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e do Doutor Manuel António Coimbra Rodrigues da Silva, Professor Associado com Agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

## **o júri**

presidente

**Doutor Jorge Manuel Alexandre Saraiva**

Professor Associado do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

**Doutora Amparo López Rubio**

Investigadora do IATA – Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, Valência, Espanha

**Doutora Idalina José Monteiro Gonçalves**

Investigadora Júnior do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

## **agradecimentos**

À Universidade de Aveiro e a todos os professores com que me cruzei pela formação e às oportunidades que me proporcionaram.

Aos meus orientadores, Doutora Idalina Gonçalves e Professor Doutor Manuel A. Coimbra por toda a ajuda e conhecimento que me transmitiram.

Aos meus pais por investirem tanto na minha educação e por terem sempre tempo para me apoiar, às vezes com muita paciência.

Por fim, a todos os meus amigos que me apoiaram e estiveram disponíveis, fosse para um café, uma conversa ou um abraço.

## palavras-chave

*Persea americana*, subprodutos, caroço de abacate, batata, amido, filmes

## resumo

O consumo de abacate tem aumentado como consequência da sua massificação, dando origem a uma elevada quantidade de subprodutos que, atualmente, são descartados, existindo assim uma oportunidade para a sua valorização. Por sua vez, o amido de batata tem sido utilizado para a produção de filmes termoplásticos biodegradáveis, no entanto estes são ainda quebradiços e hidrofílicos, não sendo competitivos comparativamente aos plásticos derivados de petróleo. Considerando a matriz rica em polissacarídeos do caroço de abacate, esta dissertação pretende explorar o seu aproveitamento no desenvolvimento de novas formulações bioplásticas à base de amido. Para o efeito, o caroço de abacate foi triturado e peneirado, resultando duas frações, uma com partículas de tamanho inferior a 150 µm, representando 13,5% do caroço (Ac), e a mais abundante com partículas de granulometria superior (Rc). As amostras obtidas eram constituídas principalmente por glucose (98,8%), determinada por GC-FID, tendo espectros de FTIR e difratogramas de Raio-X característicos do amido. A determinação de nitrogénio por análise elementar permitiu estimar uma quantidade de proteína de 0,53% para Ac e 2,59% para Rc. Para efeitos de comparação foi também analisado amido de batata recuperado a partir de pequenos fragmentos de batata, subproduto resultante da indústria de batata frita, sendo esta amostra também rica em glucose (100%) e contendo 0,02% de proteína. Os espectros de FTIR e difratogramas de Raio-X foram semelhantes aos das frações do caroço de abacate. As duas amostras de amido foram utilizadas para o desenvolvimento de filmes através da técnica de evaporação do solvente. O amido do caroço de abacate originou filmes com uma cor mais acastanhada ( $L^* = 82,4$ ;  $a^* = 2,7$ ;  $b^* = 14,6$ ) do que os filmes incolores ( $L^* = 93,3$ ;  $a^* = 1,8$ ;  $b^* = -3,57$ ) à base de amido de batata, e com uma superfície mais hidrofóbica. A presença de compostos fenólicos no caroço de abacate, bem como de enzimas oxidativas podem explicar o acastanhamento e o aumento de hidrofobicidade dos filmes. A análise das propriedades mecânicas revelou que os filmes à base de amido do caroço de abacate têm menor espessura (Ac = 63 µm; Ab = 72 µm) e esticabilidade (Ac = 13,2%; Ab = 29,8%) do que os filmes à base de amido de batata, mas apresentam maior rigidez (Ac = 517 MPa; Ab = 407 MPa) e resistência à tração (Ac = 13,1 MPa; Ab = 12,2 MPa). A diminuição da concentração de amido do caroço de abacate aumentou a rigidez, resistência à tração e esticabilidade destes filmes, mantendo o perfil de hidrofobicidade. Assim, o caroço de abacate revelou ser uma fonte de matéria-prima adequada para o desenvolvimento de filmes à base de amido mais rígidos e hidrofóbicos do que os derivados de amido de batata, diversificando as propriedades dos filmes e valorizando este subproduto da indústria alimentar.

## keywords

*Persea americana*, by-products, avocado seed, potato, starch, films

## abstract

The avocado consumption has been progressively increasing, leading to a high amount of by-products that are simply landfilled, opening an opportunity for their valorization. In addition, potato starch has been used on thermoplastic films production; however, these are still brittle and hydrophilic, and therefore non-competitive with the petrochemical-derived plastics. Given the polysaccharide-rich composition of avocado seed, this work explored its use on the development of new bioplastic starch-based formulations. For this purpose, avocado seed was milled and separated, resulting in two fractions. The starch-rich fraction (13.5%) was composed by particles smaller than 150  $\mu\text{m}$  (Ac), and the remaining residue fraction had the biggest particles (Rc). GC-FID analysis revealed that glucose was the main constituent sugar residue of the samples (98.8%). FT-IR spectra and XRD patterns were distinctive of starch-like samples. Nitrogen determination by elemental analysis revealed the estimated protein content of Ac and Rc (0.53% and 2.59%, respectively). For comparison purposes, potato starch recovered from small potato slices, a potato chips industry byproduct, was also analyzed. Potato starch was rich in glucose (100%) and had a protein content of 0.02%. Its FT-IR spectra and XRD patterns were similar to avocado starch fractions. Both starch samples were used for films production using the solvent casting technique. Avocado seed starch gave rise to films with a more brownish coloration ( $L^*=82.4$ ;  $a^*=2.7$ ;  $b^*=14.6$ ), when compared to the colorless ( $L^*=93.3$ ;  $a^*=1.8$ ;  $b^*=-3.57$ ) potato starch-based films. Avocado seed starch-based films were also more hydrophobic than potato starch-based ones. The avocado seed phenolic compounds and oxidative enzymes may be responsible for these distinguishable optical and wettability characteristics. Mechanical analysis showed that avocado seed starch-based films had lower thickness (Ac = 63  $\mu\text{m}$ ; Ab = 72  $\mu\text{m}$ ) and elongation at break (Ac = 13.2%; Ab = 29.8%), with higher rigidity (Ac = 517 MPa; Ab = 407 MPa) and traction resistance (Ac = 13.1 MPa; Ab = 12.2 MPa). Lowering the concentration of avocado seed starch promoted higher rigidity, elongation at break and traction resistance, while maintaining the hydrophobicity profile of the films. Therefore, avocado seed revealed to be an adequate source of starch for the development of rigid and hydrophobic starch-based films, with diversified properties and, at the same time, adding value to this food industry byproduct.

## Índice

1.	Introdução .....	1
1.1	O abacate .....	2
1.2	Características e aproveitamento dos subprodutos de abacate .....	6
1.3	Produção de bioplásticos à base de amido.....	11
1.3.1	Características, vantagens e desvantagens.....	11
1.3.2	Processamento de bioplásticos à base de amido .....	15
1.4	Objetivo .....	17
2.	Materiais e Métodos .....	19
2.1	Processamento dos caroços de abacate.....	19
2.2	Recuperação de amido a partir de fragmentos de batata .....	20
2.3	Caracterização das frações obtidas durante o tratamento do caroço de abacate .....	20
2.3.1	Difração de raio-X.....	21
2.3.2	Espetroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR) ....	21
2.3.3	Análise de açúcares neutros.....	21
2.3.4	Análise elementar.....	22
2.4	Preparação de filmes à base de amido.....	23
2.5	Caracterização mecânica e físico-química dos filmes.....	24
2.5.1	Propriedades óticas.....	24
2.5.2	Molhabilidade .....	24
2.5.3	Propriedades mecânicas.....	24
2.6	Análise estatística.....	25
3.	Apresentação e discussão dos resultados.....	26
3.1	Extração e caracterização das frações obtidas do caroço de abacate .....	26

3.2	Caracterização dos filmes à base de amido do caroço de abacate .....	32
3.2.1	Propriedades óticas.....	32
3.2.2	Molhabilidade .....	34
3.2.3	Propriedades mecânicas.....	35
4.	Conclusões e perspectivas futuras .....	38
5.	Referências.....	40



## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1</b> - Exemplos de variedades do abacate com floração do Tipo A e do Tipo B .....	4
<b>Tabela 2</b> - Composição nutricional do abacate [12] .....	5
<b>Tabela 3</b> - Composição química do caroço e da pele do abacate da variedade Hass, em % (m/m).....	8
<b>Tabela 4</b> - Cronograma do trabalho laboratorial previsto para o desenvolvimento da presente dissertação .....	18
<b>Tabela 5</b> – Percentagem de C, H, S, N e proteína nas amostras Ab, Ac e Rc, e percentagem de proteína estimada.....	31
<b>Tabela 6</b> - Valores de luminosidade ( $L^*$ ), coordenadas cromáticas $a^*$ e $b^*$ e diferença de cor ( $\Delta E$ ) entre os filmes à base de amido de caroço de abacate e de fragmentos de batata.....	33

## Índice de Figuras

<b>Figura 1</b> - <i>Persea americana</i> , Portugal.....	2
<b>Figura 2</b> - Os 12 países que mundialmente produzem mais abacate. ....	3
<b>Figura 3</b> - Óleo de abacate utilizado da formulação de um produto de cosmética.....	6
<b>Figura 4</b> - Processamento de abacate e percentagem (% em relação à massa húmida do abacate) de resíduos formados [18]. ....	7
<b>Figura 5</b> - Concentração de diferentes compostos bioativos presentes na polpa, na pele e no caroço de abacate. ....	9
<b>Figura 6</b> - Caroço de abacate imediatamente após o seu descasque (imagem da esquerda) e após exposição ao ar durante 40 dias (imagem da direita).....	10
<b>Figura 7</b> – Representação esquemática das ligações glicosídicas $\alpha$ -D-(1 $\rightarrow$ 6) (A.) e $\alpha$ -D-(1 $\rightarrow$ 4) (B.), da amilopectina (C.) e da amilose (D.). ....	12
<b>Figura 8</b> - Diferentes etapas do processo de gelatinização do amido. ....	12
<b>Figura 9</b> – Materiais à base de amido termoplástico.....	14
<b>Figura 10</b> – Etapas da técnica de evaporação do solvente. ....	15
<b>Figura 11</b> - Exemplo de uma extrusora monofuso.....	16

<b>Figura 12</b> - Etapas de investigação realizadas ao longo do trabalho experimental da presente dissertação. ....	19
<b>Figura 13</b> - Difrátogramas das amostras de amido de caroço de abacate (Ac), resíduo do caroço de abacate (Rc) e amido de batata (Ab). ....	27
<b>Figura 14</b> - Espectros de FTIR das amostras de amido de caroço de abacate (Ac), resíduo do caroço de abacate (Rc) e amido de batata (Ab). ....	28
<b>Figura 15</b> - Gráfico das pontuações da análise PCA (PC1 vs. PC2) dos espectros de FT-IR das amostras Ac e Rc, na região de comprimentos de onda 1200-800 $\text{cm}^{-1}$ . ....	29
<b>Figura 16</b> - Gráfico dos carregamentos da análise PCA (PC1 e PC2) dos espectros FT-IR das amostras Ac e Rc, na região dos números de onda 1200-800 $\text{cm}^{-1}$ . ....	29
<b>Figura 17</b> – Cromatogramas da composição em açúcares das amostras Ac, Rc e Ab obtidos por GC-FID. ....	31
<b>Figura 18</b> - Filme à base do amido de caroço de abacate (imagem à esquerda) e filme de amido de batata (imagem à direita). ....	32
<b>Figura 19</b> - Gráfico com os valores de ângulo de contacto das superfícies "Bottom" e "Top" dos filmes à base de amido de batata (Ab) e à base de amido do caroço de abacate (Ac), sendo neste último preparado filmes com 3% e 4% de amido. ....	34
<b>Figura 20</b> - Representação gráfica dos valores de espessura, módulo de Young, elongação na rutura e resistência à tração de filmes à base de de amido do caroço do abacate (Ac), com concentração de 3% e 4%, e à base de amido dos fragmentos de batata (Ab). ....	36

## **1. Introdução**

Na sociedade atual existe um conhecimento cada vez maior sobre nutrição e as suas implicações na saúde, especialmente no que toca ao consumo regular de frutas e vegetais [1]. Consequentemente são, cada vez mais, procurados alimentos nutricionalmente ricos, contendo macronutrientes e outras substâncias benéficas para a saúde, tal como o abacate [2]. Como resultado da sua elevada procura prevê-se que a produção do abacate continue a aumentar, o que leva a que sejam produzidos cada vez mais resíduos provenientes do seu consumo e processamento industrial. O descarte destes resíduos resulta não só em custos elevados de transporte para aterros sanitários, como pode também provocar graves problemas ambientais devido à deposição de grandes quantidades de biomassa [3]. Tendo em conta este problema, a comunidade científica tem procurado estudar estes subprodutos, nomeadamente o caroço de abacate, de modo a perceber qual a sua composição e quais as suas aplicações industriais, com a finalidade de promover uma maior sustentabilidade ambiental. Esta visão coincide com o objetivo do trabalho desta dissertação, onde o caroço de abacate foi estudado e se pretendeu encontrar alternativas para a valorização deste subproduto.

Para além das características e aplicações do caroço de abacate, a introdução teórica do presente documento irá abordar desde a taxonomia e origem do abacateiro até à sua produção e diferentes variedades. Além disso serão também mencionadas as características e benefícios para a saúde do abacate que têm impulsionado o seu consumo e, consequentemente, originado elevadas quantidades de subprodutos, nomeadamente o caroço e a pele do abacate. O estudo do caroço de abacate surge como estratégia para valorizar este resíduo da indústria alimentar, promovendo uma economia circular e o desenvolvimento de plásticos sustentáveis e biodegradáveis.

## 1.1 O abacate

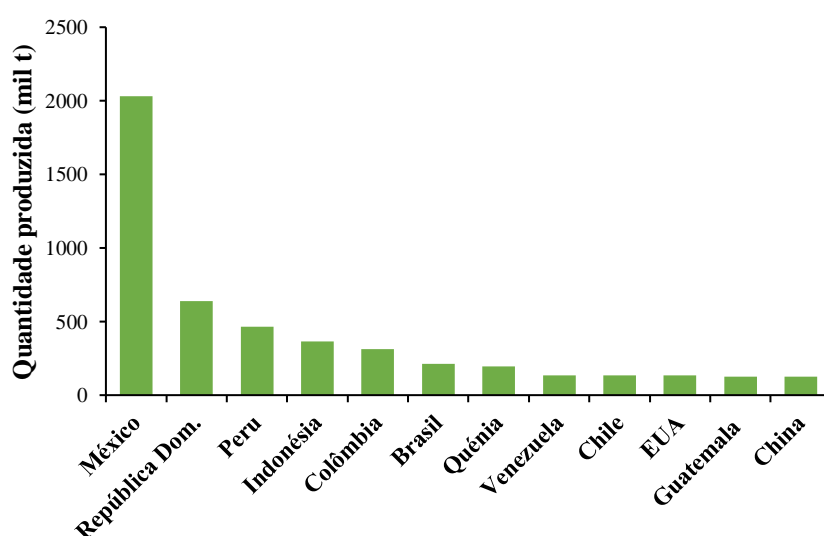
O abacateiro, a planta que produz o abacate (**Figura 1**), é uma árvore pertencente à família *Laureaceae* e ao género *Persea*, conhecida pela sua predominância em zonas tropicais e subtropicais, contando com cerca de 50 espécies. A sua classificação taxonómica, *Persea americana*, remonta à zona da sua origem (continente Americano) [4]. A floração de *Persea americana* é peculiar, sendo esta uma espécie dicógama. Este fenómeno traduz-se na existência de um período em que a flor tem inicialmente um comportamento feminino, com estigmas recetivos e, de seguida, um período em que a flor tem um comportamento masculino, em que o estigma não se encontra recetivo, aparecendo as anteras expondo pólen. No caso desta espécie, a dicogamia é sincronizada, o que significa que todas as flores estão no mesmo estado de maturação na planta, pelo que a probabilidade de autopolinização é reduzida. As variedades de abacate são então distinguidas por “A” e “B”, de acordo com a altura do dia em que a flor abre [5]. Esta designação facilita a utilização de plantações com florações distintas, permitindo a polinização cruzada e um aumento no rendimento de frutos [5]. Após a formação do fruto, o seu amadurecimento apenas acontece após este ser retirado da árvore, permitindo a sua permanência no abacateiro num estado de amadurecimento ideal, durante vários meses, sem se degradar [6]. Esta característica torna possível ter frutos todo o ano, para além da época ideal de colheita.



*Figura 1 - Persea americana, Portugal.*

O abacateiro foi cultivado por diversos povos durante gerações, surgindo novos tipos de abacate devido a fenómenos de seleção artificial, onde se procurou uma melhoria no tamanho do fruto e do seu sabor, bem como uma maior proporção entre a polpa e o









caroço [5]. Atualmente, a produção de abacate é levada a cabo por 57 países, sendo o México onde existe uma maior produção (34%), ocupando cerca de 231,028 hectares. Na lista de maiores produtores, representada na **Figura 2**, estão também outros países do continente Americano, como a República Dominicana, o Perú e a Colômbia [7]. Em Portugal tem existido um aumento progressivo da área ocupada com plantações de abacateiros, sobretudo na região algarvia. As condições climáticas favoráveis e a rentabilidade do abacate levam a que, atualmente, existam cerca de 180 explorações de abacateiros, ocupando uma área total de 1500 hectares [8].



*Figura 2 - Os 12 países que mundialmente produzem mais abacate.*

O abacate é também conhecido por “pera abacate” devido à sua forma usualmente piriforme. Das suas características destacam-se a sua pele rugosa e a existência de um único caroço de grandes dimensões, havendo variações nas características de acordo com a variedade [9]. Atualmente existem mais de 500 variedades de abacate identificadas, pelo que a maioria destas não são comercializadas devido a problemas como o tempo de produção excessivo, fraca qualidade proteica e/ou lipídica e elevada sensibilidade ao clima e ao transporte, tornando-as pouco rentáveis [6]. Mesmo assim, as variedades comercializadas são muito diversificadas em termos de características, desde o sabor até ao seu tamanho. Estas são maioritariamente baseadas na antiga variedade “Mexican”, “Guatemalan” ou híbridos de ambas [10]. A **Tabela 1** mostra as variedades mais relevantes, compreendidas no tipo “A” e “B”.

**Tabela 1** - Exemplos de variedades do abacate com floração do Tipo A e do Tipo B

Tipo A		Tipo B	
	Hass	Fuerte	
	Gwen	Zutano	
	Pinkerton	Bacon	
	Reed	Whitsell	

O abacate é também conhecido pelo seu elevado valor nutritivo (**Tabela 2**), o que perspectiva um aumento no seu cultivo e consumo. A sua polpa contém uma elevada quantidade de fibras solúveis e insolúveis, tendo também quantidades consideráveis de açúcares (especialmente sacarose e a D-mano-heptulose, 0,8 - 4,8%), pigmentos, taninos, polifenóis, fitoestrogénios e perseitol [10]. Esta contém também aproximadamente 2,3% de proteína, do seu peso total, estando presentes todos os aminoácidos essenciais, tornando o abacate uma fruta rica em proteínas comparativamente à maioria dos frutos, mas não em relação a outro tipo de alimentos, como as carnes e os lacticínios [11]. Para além de ser rica em água, a polpa do abacate apresenta uma grande percentagem de lípidos (8-22%), o que justifica o seu elevado valor calórico de 800 kJ por cada 100 g [11]. A maioria desta fração lipídica corresponde a triacilgliceróis, mais concretamente ácidos gordos insaturados, o que leva a que o abacate seja escolhido como um alimento adequado para uma dieta

equilibrada [11]. Destaca-se também a elevada diversidade de minerais presentes na polpa (cálcio, ferro, magnésio, fósforo, potássio e zinco), bem como as diversas vitaminas, em especial o ácido ascórbico, retinol, riboflavina, tiamina, entre outras.

*Tabela 2 - Composição nutricional do abacate [12]*

Nutrientes	Valor por 100 g de abacate
Água (g)	72,3
Energia (kcal)	167
Proteína (g)	1,96
Lípidos (g)	15,4
Fibras (g)	6,80
Açúcares (g)	0,300
Amido (g)	0,110
Minerais (mg)	611
Vitaminas e fitoquímicos (mg)	14,7

A presença de diversas macromoléculas no abacate, bem como o seu conteúdo nutricional, levam a que este seja mundialmente conhecido e consumido devido aos seus benefícios para a saúde [11], sendo considerado um alimento funcional [13]. Esta classificação deve-se à presença de fitoesteróis, como o  $\beta$ -sitosterol (sendo o fruto mais rico existente na natureza), o campesterol e o estigmasterol que, sendo análogos do colesterol, vão impedir a sua absorção, tendo um papel importante na manutenção dos níveis de colesterol no organismo [14]. A elevada quantidade de ácidos gordos insaturados leva a um aumento da concentração de lipoproteínas de alta densidade (HDL) no sangue, contribuindo também para a redução do colesterol, fazendo com que o consumo do abacate contribua para a diminuição do risco de doenças cardiovasculares [11]. O abacate é também indicado para a prevenção de acidentes vasculares cerebrais (AVC), dada a presença de quantidades elevadas de potássio (507 mg/100 g) e reduzidas quantidades de sódio. Tendo em conta a necessidade diária de 3510 mg de potássio [15], a introdução de abacate numa dieta rica e equilibrada leva a uma redução do risco de AVC [2]. Por sua vez, o abacate apresenta atividade antioxidante moderada, devido à presença de compostos fenólicos e de vitaminas C e E. Ao nível do organismo, o consumo de antioxidantes leva à redução do stress oxidativo, protegendo o DNA, tendo também um papel ativo na promoção da saúde

cardiovascular [2]. Estudos apontam também que existem diversos fitoquímicos no abacate, com um papel importante na indução da paragem do ciclo celular, inibição do crescimento ou até a apoptose de linhas celulares cancerígenas [16]. Assim, o consumo de abacate pode prevenir o aparecimento de cancro.

Além do seu consumo como alimento existe também uma tendência para a utilização de extratos de abacate em cosméticos para a pele, cabelo, entre outros produtos de beleza, como mostra a **Figura 3**. Este fenómeno deve-se à presença de carotenóides, bem como de luteína e zeaxantina, que têm um papel importante no combate a danos oxidativos e inflamatórios da pele, provocados pela radiação visível e UV [2]. Assim, o consumo de abacate, bem como a utilização dos seus extratos, protegem a pele de envelhecimento precoce e stress oxidativo.

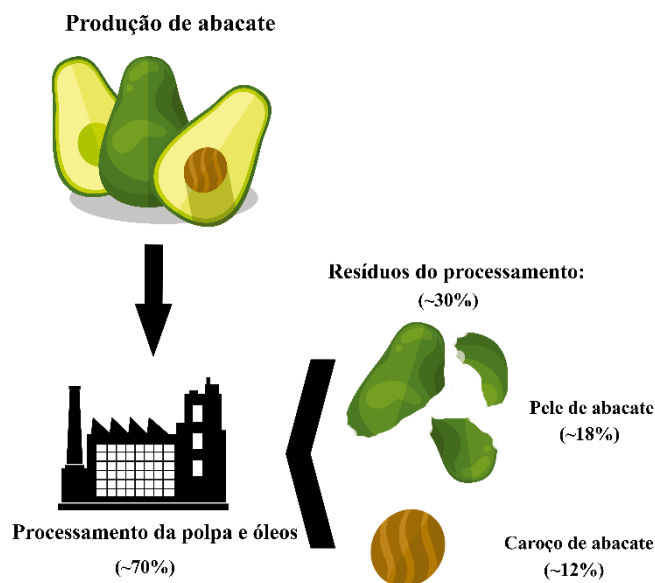


*Figura 3 - Óleo de abacate utilizado da formulação de um produto de cosmética.*

## 1.2 Características e aproveitamento dos subprodutos de abacate

O processamento industrial de abacates baseia-se maioritariamente no aproveitamento da sua polpa para a produção de pastas, como a guacamole. Após este processamento, a pele de abacate e o seu caroço são normalmente descartados, podendo corresponder a 18% e 12% da massa total do mesmo, respetivamente [17]. Na **Figura 4** estão representados o processamento industrial de abacate e os subprodutos descartados.





**Figura 4** - Processamento de abacate e percentagem (% em relação à massa húmida do abacate) de resíduos formados [18].

A título de exemplo, no México, em 2008, foram produzidos cerca de 1,12 milhões de toneladas de abacates, estimando-se que 5% destes abacates foram processados industrialmente. Assim sendo considera-se que tenham sido descartados cerca de 20 mil toneladas de resíduos de abacate [19]. O tratamento de grandes quantidades de resíduos sólidos é dispendioso e demorado, pelo que muitas vezes este tipo de resíduos acaba em aterros sanitários ou são ilegalmente descartados, provocando graves problemas ambientais [19]. Assim, para além da própria polpa do abacate que é descartada e contém valor alimentar, é necessário valorizar todos os resíduos de abacate para que estes sejam reutilizados, promovendo, assim, uma economia circular [20].

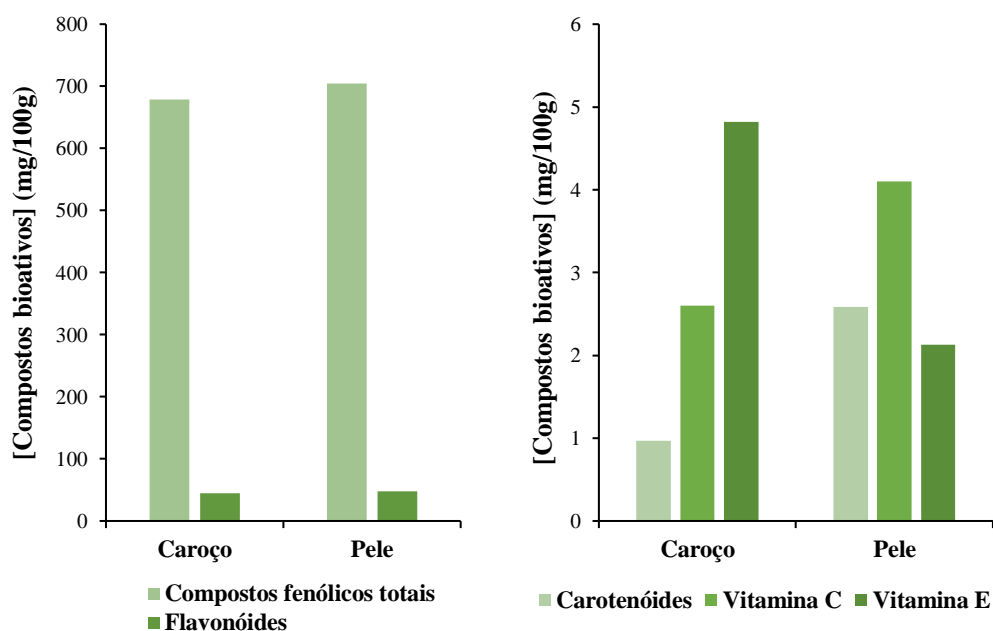
O caroço de abacate corresponde a 12% da massa húmida do fruto. Sendo o abacate a 4ª fruta tropical mais vendida no mundo, com uma produção estimada de 4,7 milhões de toneladas, mesmo que apenas uma percentagem seja processada industrialmente, milhares de toneladas de caroços de abacate são descartados anualmente [21]. Sendo este de grandes dimensões consegue ser facilmente separado da polpa e, dada a sua matriz rica em polissacarídeos, consegue ser facilmente guardado sem se degradar. De modo a promover o aproveitamento de resíduos agroalimentares, os subprodutos de abacate têm sido cada vez mais estudados, em especial o caroço de abacate.

Em relação ao caroço e à pele de abacate, na **Tabela 3** estão presentes as composições químicas destes resíduos. Para além da presença de minerais e lípidos, em quantidades reduzidas, podemos verificar que estes são ricos em hidratos de carbono, como celulose (no caso da pele) ou amido (no caso do caroço), que podem ser extraídos e utilizados em diversas aplicações industriais [10]. A elevada percentagem de hemicelulose, reportado como uma fração de polissacarídeos remanescente após a extração de lenhina e de celulose, revela a existência de açúcares, que podem ser extraídos e aproveitados [22].

**Tabela 3** - Composição química do caroço e da pele do abacate da variedade Hass, em % (m/m)

	Caroço	Pele
Humidade [23]	7,66	14,5
Minerais [23]	3,85	6,05
Lípidos [23]	5,52	9,14
Fibras [23]	3,98	50,7
Proteínas [23]	3,44	8,28
Açúcares [23]	79,5	62,0
Celulose [22]	6,48	34,4
Hemicelulose [22]	47,9	27,6
Amido [24]	30,2	

Estudos mostram que tanto o caroço, como a pele do abacate contêm compostos fenólicos em quantidades significativas, bem como flavonóides, carotenóides e vitaminas C e E, que conferem uma atividade antioxidante superior à existente na polpa [25]. Os gráficos da **Figura 5** mostram a concentração de compostos bioativos nos resíduos do abacate, frisando a presença significativa de compostos fenólicos na pele e no caroço.



**Figura 5** - Concentração de diferentes compostos bioativos presentes na polpa, na pele e no caroço de abacate.

Com o intuito de minimizar estas perdas tem sido explorada a possibilidade de utilização destes subprodutos como matéria-prima para a obtenção de antioxidantes e compostos fenólicos [18] que, tal como no caso do abacate, o seu consumo em alimentos é crucial na prevenção de doenças cardiovasculares, diabetes, Alzheimer, entre outras. O seu consumo também evita condições de stress oxidativo no nosso organismo [26]. A extração destas substâncias do caroço e da pele do abacate permite o enriquecimento nutricional de outros alimentos [27], promovendo a criação de novos alimentos funcionais [28]. Porém, os subprodutos do abacate, quando descascados e expostos ao ar, sofrem reações de acastanhamento, justificado pela elevada concentração de compostos fenólicos. O acastanhamento ocorre devido à oxidação enzimática e não enzimática [29] de polifenóis presentes no tecido do caroço de abacate, que dão origem a *o*-quinonas facilmente polimerizáveis em pigmentos vermelhos, castanhos ou pretos, dependendo das condições do meio. No caso das reações enzimáticas, estas são mediadas pela enzima polifenoloxidase (PPO), à semelhança do que acontece noutros frutos [30]. A presença de PPO está diretamente relacionada com o grau de acastanhamento do caroço de abacate (**Figura 6**), pelo que quanto maior a concentração desta enzima no caroço, maior será o seu acastanhamento [31]. A PPO revela também ter uma elevada resistência à temperatura, relativamente a outras enzimas, havendo estudos mostrando a sua estabilidade

a 58 °C, e ainda mantendo alguma atividade a 70 °C [31]. O aquecimento dos caroços de abacate para além desta temperatura leva à inativação da PPO, no entanto, caso seja adicionado um extrato de PPO exógeno após este aquecimento, o acastanhamento é retomado, confirmando o facto de este acastanhamento ser dependente desta enzima [30].



**Figura 6** - Caroço de abacate imediatamente após o seu descasque (imagem da esquerda) e após exposição ao ar durante 40 dias (imagem da direita).

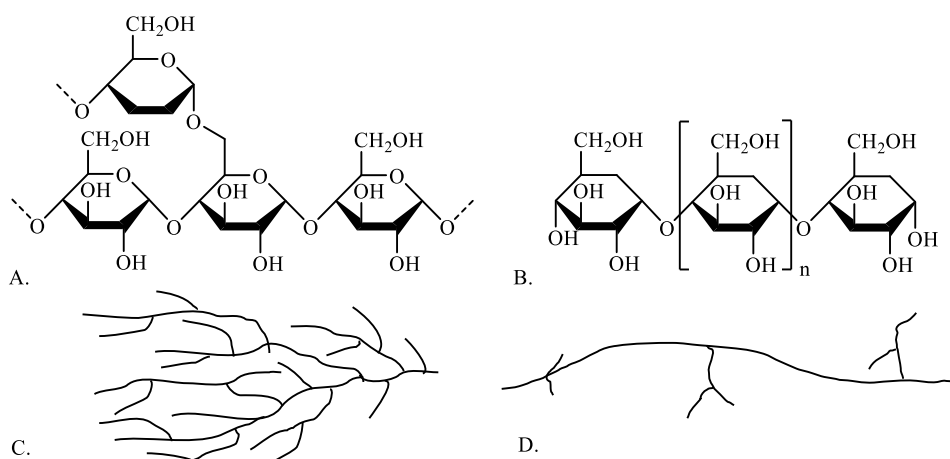
Outra alternativa para a reutilização destes subprodutos seria a sua utilização como biocombustíveis para a produção de energia [21]. A sua baixa percentagem de cinzas (compostas pelos minerais presentes no caroço), bem como de compostos nocivos como o cloro e enxofre leva a que a sua combustão seja relativamente limpa, comparativamente a resíduos de biomassa utilizados para combustão, como *pellets* de madeira de oliveira ou carvalho. Contudo, como os subprodutos de abacate apresentam uma elevada percentagem de humidade (cerca de 30%), relativamente a outros resíduos utilizados, estes teriam de passar por um processo de secagem antes de serem utilizados como biocombustíveis [21]. Numa sociedade em constante crescimento, onde a fonte principal de energia provém dos combustíveis fósseis, um recurso finito e altamente poluente, é necessário procurar alternativas renováveis e neutras em carbono. A utilização de biomassa, como os caroços de abacate, para obtenção de energia, não só aproveita um resíduo que outrora seria descartado, como também seria uma alternativa sustentável aos combustíveis fósseis [21].

Tendo em conta a elevada concentração de polissacarídeos como o amido ou a celulose, a produção de bioplásticos à base dos subprodutos de abacate tem sido alvo de estudo [20]. A utilização de celulose como matriz de filmes tem revelado ser vantajosa devido às propriedades de barreira de oxigénio [32]. Por sua vez, o facto de o amido se comportar como um termoplástico, devido à sua capacidade de gelatinização, leva a que seja possível produzir bioplásticos a partir de diversas técnicas, como a evaporação de solvente [33], extrusão [34], entre outras, com algumas características semelhantes aos plásticos de origem fóssil.

### **1.3 Produção de bioplásticos à base de amido**

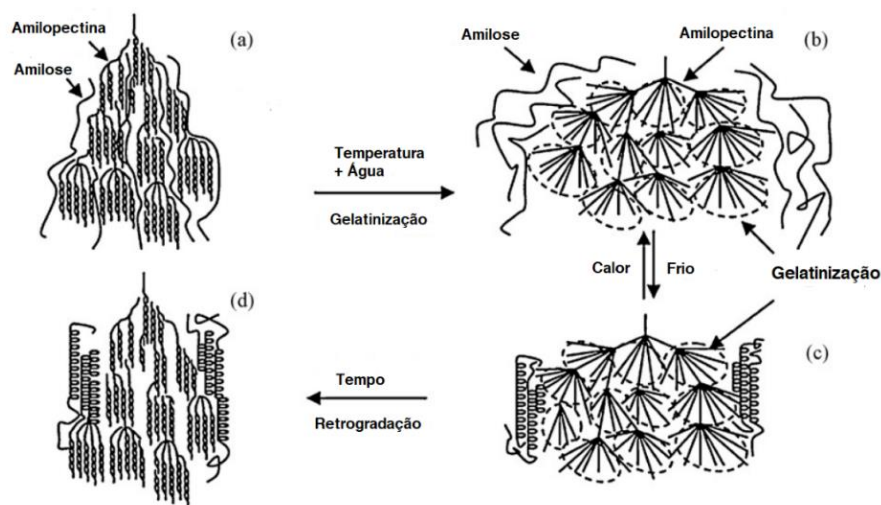
#### **1.3.1 Características, vantagens e desvantagens**

O amido é um polissacarídeo produzido por plantas, como meio de armazenamento de energia. Este é sintetizado nas folhas durante o dia, através da fotossíntese (fixação de carbono), sendo mobilizado para amiloplastos, estruturas presentes em órgãos de armazenamento, como raízes, sementes ou frutos. O amido é composto por polímeros de glucose, a amilopectina e a amilose (**Figura 7**), organizados em estruturas tridimensionais e semi-cristalinas, denominadas grânulos de amido [35]. A amilopectina corresponde a uma molécula altamente ramificada, composta por cadeias de glucose ligadas por ligações  $\alpha$ -D-(1 $\rightarrow$ 4), com ramificações através de ligações  $\alpha$ -D-(1 $\rightarrow$ 6) [36]. A amilose é uma molécula predominantemente linear com monómeros de glucose ligados através de ligações glicosídicas  $\alpha$ -D-(1 $\rightarrow$ 4), contendo também algumas ramificações estruturalmente semelhantes à amilopectina, na ordem dos 2% [37].



**Figura 7** – Representação esquemática das ligações glicosídicas  $\alpha$ -D-(1 $\rightarrow$ 6) (A.) e  $\alpha$ -D-(1 $\rightarrow$ 4) (B.), da amilopectina (C.) e da amilose (D.).

O amido, quando submetido a condições específicas de temperatura num meio com excesso de água, sofre um processo denominado de gelatinização (**Figura 8**). No início do aquecimento (20 a 60 °C), as ligações de hidrogénio entre as diferentes cadeias poliméricas são enfraquecidas, permitindo a absorção de água e consequente aumento da viscosidade da dispersão [36]. Com o aumento da temperatura, as ligações de hidrogénio continuam a deteriorar-se e as moléculas de água ligam-se aos grupos hidroxilo das unidades de glucose das cadeias de amilose e amilopectina. Os grânulos incham consideravelmente, libertando amilose e outros componentes para o meio [38], formando-se um gel [39], que possibilita a produção de bioplásticos.



**Figura 8** - Diferentes etapas do processo de gelatinização do amido.

Para além desta vantagem, a elevada presença deste polissacarídeo, não só na natureza, como também em diversos subprodutos da indústria agroalimentar, leva a que este seja um polímero abundante e economicamente atrativo. Estas razões levam a que o amido, relativamente a outros polímeros naturais, seja uma boa alternativa aos plásticos de origem fóssil [33]. No entanto, a elevada afinidade do amido para com a água origina materiais hidrofílicos, o que limita a sua aplicação [40]. Para além disso, os filmes à base de amido são quebradiços, condição causada pela fraca mobilidade entre as cadeias de amilose e amilopectina e pelo processo de recristalização do amido [36]. Para que os bioplásticos à base de amido tenham propriedades competitivas com as dos polímeros sintéticos têm sido adicionados coadjuvantes, nomeadamente agentes plasticizantes e agentes de reforço, durante a sua produção. Os agentes plasticizantes conferem flexibilidade e alongação, interagindo com as cadeias de amido e conferindo-lhes mobilidade. A adição destes compostos provoca um aumento na elasticidade através da redução das ligações de hidrogénio entre as cadeias poliméricas [36]. O glicerol, por exemplo, é um agente plasticizante frequentemente adicionado a formulações de amido [41], melhorando a plasticidade dos bioplásticos e tornando-os menos quebradiços. Por sua vez, os agentes de reforço têm a capacidade de aumentar a resistência à tração e a força dos materiais até rutura, tornando os bioplásticos de amido mais rígidos e consistentes devido às interações intermoleculares entre a matriz polimérica do amido e os compostos adicionados. As fibras celulósicas são misturas de polissacarídeos normalmente utilizadas como agentes de reforço em formulações à base de amido [42].

Para que seja mantido o carácter sustentável dos bioplásticos à base de amido, os subprodutos industriais ricos em biomoléculas de interesse para o desenvolvimento destes materiais, como resíduos fibrosos da extração de polissacarídeos [33], celulose, lenhina [42] ou óleos vegetais [43], têm sido considerados como potenciais matérias-primas. Estes poderão ser utilizados diretamente na formulação à base de amido ou, caso não seja possível, os compostos de interesse poderão ser extraídos destes resíduos e posteriormente incorporados nas formulações. Na **Figura 9** estão representados materiais à base de amido termoplástico utilizados para acondicionamento de produtos em embalagens, representando uma alternativa biodegradável aos materiais à base de poliestireno frequentemente utilizados.



**Figura 9** – Materiais à base de amido termoplástico.

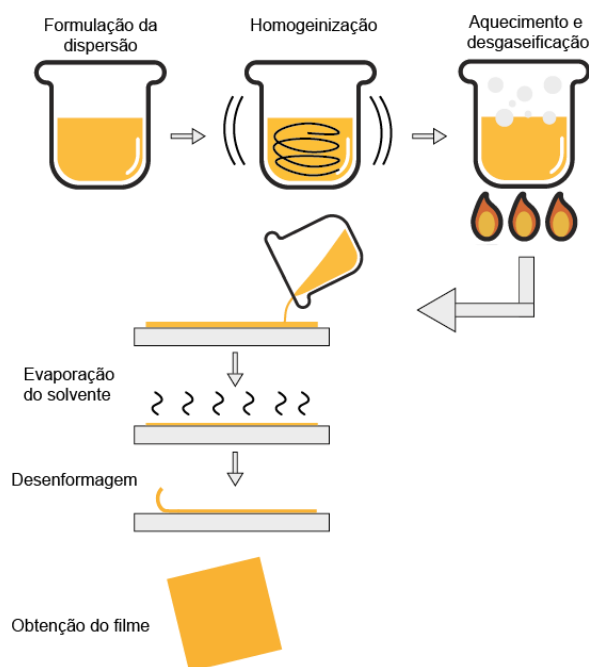
Os bioplásticos à base de amido são muitas vezes indicados como substituintes dos plásticos de origem fóssil em embalagens alimentares. Ao utilizarem-se materiais naturais e biodegradáveis para o embalamento de alimentos existem novas possibilidades nesta indústria, como a produção de embalagens edíveis [44], ou até mesmo de embalagens que reagem ativamente com o produto. Assim, procuram-se substâncias que, para além de seguras para o consumidor, adicionem propriedades às embalagens que permitam preservar os alimentos que estão contidos nelas. Para conferir estas propriedades, podem ser utilizadas substâncias naturais com propriedades antimicrobianas, como o óleo de canela, cravinho, entre outros, adicionando-as como aditivos na formulação de bioplásticos [45].



### 1.3.2 Processamento de bioplásticos à base de amido

Existem várias técnicas para o processamento de plásticos à base de petróleo, pelo que a escolha das mesmas para uma indústria depende do tipo de plástico utilizado, da finalidade do mesmo, do investimento disponível, entre outros parâmetros. Tendo em conta a diferença entre os plásticos à base de petróleo e formulações à base de amido, aquando a utilização de uma técnica de processamento de plásticos para bioplásticos à base de amido, as suas condições têm de ser estudadas e compatibilizadas. A evaporação do solvente, a extrusão e a injeção em moldes são algumas das técnicas utilizadas em plásticos à base de petróleo e adaptadas para formulações à base de amido, com o objetivo de produzir bioplásticos com características distintas [46].

No caso da técnica de evaporação do solvente, esta é realizada através da preparação de uma dispersão aquosa à base de amido, que é gelatinizada e colocada numa placa ou molde, formando uma camada fina que, depois de seca, forma um filme [36]. A **Figura 10** mostra algumas etapas relativas a esta técnica, muito utilizada à escala laboratorial, dada a sua simplicidade e facilidade de adição de outras substâncias à dispersão à base de amido. No entanto, esta é limitativa em termos de quantidade produzida [46], sendo difícil o seu *scale-up*.



**Figura 10** – Etapas da técnica de evaporação do solvente.

Por sua vez, na extrusão, o processo de gelatinização é realizado na própria extrusora, onde o amido, na presença de plasticizantes, é processado em condições de elevada fricção e temperatura. Esta técnica permite que o amido gelatinize na presença de pouca quantidade de água, devido à fragmentação mecânica dos grânulos e consequente entrada de água nas moléculas de amido [47]. Existem diferentes tipos de extrusoras, pelo que a maioria dos equipamentos contém um fuso (ou um fuso duplo) e um sistema de aquecimento (através de resistências, vapor de água, entre outros). O amido é introduzido na extrusora, juntamente com água e outros compostos de interesse. O fuso transporta o amido num circuito fechado, ocorrendo o processo de gelatinização e consequente retrogradação, sendo moldados na forma desejada [36]. Na **Figura 11** está representado um exemplar de uma extrusora monofuso.



*Figura 11 - Exemplo de uma extrusora monofuso.*

A utilização da técnica de extrusão tem a vantagem de facilmente se adaptar o processo à escala industrial, sendo das técnicas mais utilizadas para processar plásticos de origem fóssil [47]. Porém, o comportamento reológico das formulações à base de amido ainda dificultam a sua extrusão [36]. Para além disso, a utilização de temperaturas acima de 100 °C leva a que ocorram reações de acastanhamento e a degradação do amido [47] e, portanto, há a necessidade de desenvolver estratégias que contribuam para ultrapassar estes desafios tecnológicos. Por fim, a injeção em moldes de dispersões gelatinizadas à base de amido é dificultada devido à sua elevada viscosidade e à evaporação de água durante o processo. A adaptação desta matéria-prima para equipamentos convencionais é assim dificultada [36], pelo que esta técnica é pouco utilizada no que toca a formulações de amido.

## 1.4 Objetivo

A presente dissertação tem como objetivo o estudo do caroço de abacate e a sua valorização através do desenvolvimento de formulações bioplásticas, não só devido à presença de amido na sua constituição, como também de compostos fenólicos, que poderão contribuir para a modulação das propriedades mecânicas e físico-químicas dos bioplásticos à base de amido. Vários estudos mostraram que é possível extrair cerca de 20% (em relação à massa seca do caroço de abacate) de amido [3,48]. O restante resíduo do caroço de abacate poderá ser aproveitado como fonte de polissacarídeos, que poderão servir como aditivos dos bioplásticos à base de amido. No entanto, tendo em conta que existe pouca informação sobre o tipo de polissacarídeos presentes no caroço de abacate, a presente dissertação contribuirá para o aumento do conhecimento sobre a química do caroço de abacate.

Dado que até à data não se explorou o acastanhamento do caroço de abacate no âmbito do desenvolvimento de bioplásticos à base de amido, o objetivo desta dissertação também consiste em estudar a influência dos compostos fenólicos que dão origem às reações de acastanhamento no desempenho de formulações plásticas à base de amido. Esta incorporação tem o intuito de ultrapassar a fragilidade mecânica e a hidrofobicidade dos bioplásticos à base de amido e, assim, obter uma alternativa ecológica para os plásticos de origem fóssil, enquanto promovendo a economia circular. Para efeitos de comparação, nesta dissertação foi utilizado amido de batata recuperado de fragmentos de batata existentes em lamas de lavagem industrial de batata. Para alcançar estes objetivos, o trabalho experimental desta dissertação englobará a extração e caracterização de amido existente no caroço de abacate e a sua aplicação no desenvolvimento de filmes à base de amido, seguindo o cromatograma indicado na **Tabela 4**. De realçar que, nos últimos meses, identificados a tracejado vermelho, deixou de ser possível o trabalho laboratorial, devido à pandemia Covid-19 desencadeada pelo vírus SARS-CoV-2, afetando a conclusão dos objetivos previstos.

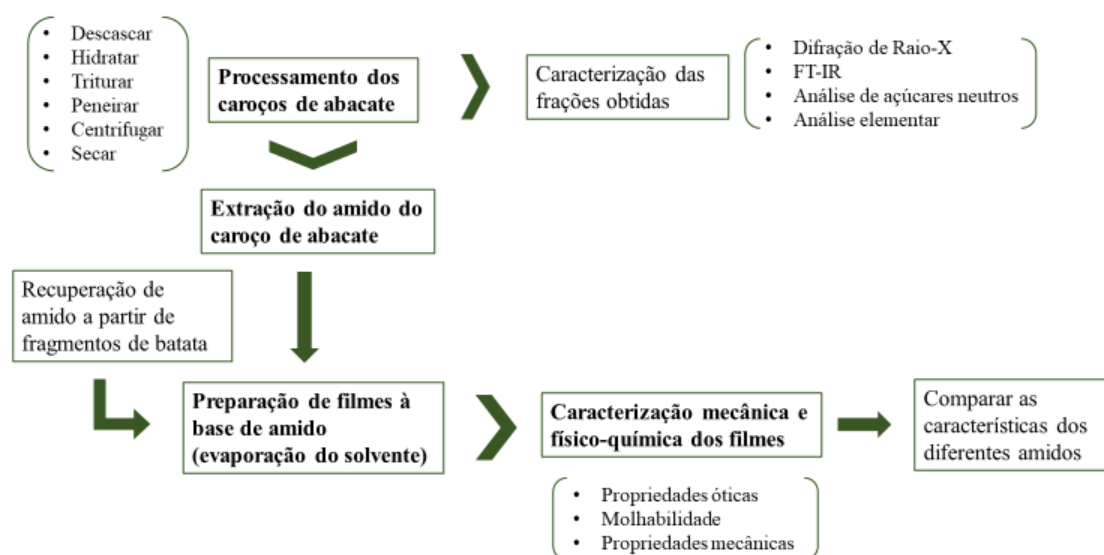
**Tabela 4 - Cronograma do trabalho laboratorial previsto para o desenvolvimento da presente dissertação**

	Out'19	Nov'19	Dez'19	Jan'20	Fev'20	Mar'20	Abr'20	Mai'20	Jun'20
Fracionamento e caracterização do caroço de abacate	X	X	X	X	X	X			
Desenvolvimento de bioplásticos			X	X	X	X	X		
Escrita e apresentação da dissertação							X	X	X

## 2. Materiais e Métodos

Neste trabalho foram utilizados caroços de abacate, obtidos após o consumo alimentar da polpa de abacate, que permaneceram com a casca armazenados à temperatura ambiente, num recipiente aberto, de modo a evitar a sua oxidação e o aparecimento de humidade e bolores. Os fragmentos de batata recuperados das lamas de lavagem industrial de batata foram disponibilizados pela empresa portuguesa de batatas fritas “A Saloinha, Lda.”. O glicerol (99,5%) utilizado foi adquirido na Scharlab e o metabissulfito de sódio foi obtido na Panreac.

A **Figura 12** apresenta um fluxograma que descreve as várias etapas de investigação e métodos que foram utilizados durante a realização do trabalho laboratorial.



**Figura 12** - Etapas de investigação realizadas ao longo do trabalho experimental da presente dissertação.

### 2.1 Processamento dos caroços de abacate

O amido dos caroços de abacate foi recuperado adaptando o método utilizado por Silva et al. [48]. Inicialmente removeu-se a pele dos caroços e estes foram cortados em pedaços. Em seguida, os caroços descascados foram hidratados numa solução de metabissulfito de sódio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ) de concentração 0,2%, em quantidade suficiente para proceder à suspensão total dos caroços nesta, *overnight*. Com o auxílio de uma liquidificadora comercial (Waring), os caroços de abacate hidratados foram triturados

juntamente com a solução de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ . A amostra triturada foi imediatamente peneirada recorrendo a um agitador mecânico de peneiros (Retsch), equipado com um peneiro de 90  $\mu\text{m}$  de malha e um sistema de peneiramento a húmido, obtendo-se assim uma dispersão aquosa com um sedimento branco e um resíduo sólido que ficou retido no peneiro. Após sedimentação à temperatura ambiente, *overnight*, o precipitado branco foi separado do sobrenadante por decantação, ressuspenso em água destilada e centrifugado a 5000 rpm, à temperatura ambiente, durante 15 minutos. Este processo foi realizado em triplicado. Posteriormente, o precipitado branco e o resíduo sólido foram secos numa estufa a 40 °C *overnight* e arrefecidos/armazenados num exsiccador contendo sílica-gel até posterior utilização.

De modo a facilitar a análise físico-química do precipitado branco, bem como do resíduo sólido, o pó resultante foi triturado num moinho de lâminas (IKA A10 basic) e peneirado no agitador mecânico de peneiros, utilizando-se peneiros com diferentes granulometrias (63  $\mu\text{m}$ , 90  $\mu\text{m}$ , 150  $\mu\text{m}$  e 300  $\mu\text{m}$ ). Na caracterização de cada fração, bem como na formulação de filmes, apenas foi utilizada a granulometria de 63  $\mu\text{m}$ .

## **2.2 Recuperação de amido a partir de fragmentos de batata**

Neste trabalho laboratorial foram utilizados os fragmentos de batata presentes nas lamas de lavagem industrial de batata. Para a lavagem e separação dos fragmentos recorreu-se ao sistema de peneiramento a húmido, com um peneiro de 150  $\mu\text{m}$ . Estes foram colocados em recipientes com uma solução aquosa de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ , triturados, separados e centrifugados, seguindo o procedimento referido em 2.1.

## **2.3 Caracterização das frações obtidas durante o tratamento do caroço de abacate**

Para melhor compreender as biomoléculas recuperadas de cada subproduto, foi determinada a cristalinidade (raio-X), as interações moleculares (FT-IR), o conteúdo em açúcares e o teor de proteína da fração branca proveniente do caroço de abacate (Ac), do resíduo derivado do caroço de abacate (Rc) e dos fragmentos de batata (Ab).

### 2.3.1 Difração de raio-X

Os difratogramas de cada amostra foram obtidos através de uma análise qualitativa de fases cristalinas por difração de raio-X, com o difratômetro PANalytical Empyrean. Uma pequena porção da amostra foi colocada num suporte de difração zero, sendo introduzido de seguida no aparelho de raio-X. Este operou a uma voltagem de 45 kV e a uma corrente de 40 mA, com um intervalo de ângulos  $2\theta$  de  $4^\circ$  a  $40^\circ$ . Cada análise teve uma duração de 196 segundos, a uma resolução de  $0,04^\circ$ .

### 2.3.2 Espetroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR)

Os espectros de FT-IR foram obtidos utilizando o espectrofotômetro Perkin Elmer Spectrum BX. Começou-se por fazer uma análise do *background*, sem amostra no aparelho. Posteriormente, colocou-se uma porção de cada fração diretamente na lente do aparelho, de modo a cobrir toda a sua superfície. Os espectros foram gerados em modo de absorção, utilizando ondas de infravermelho compreendidas entre  $4000$  e  $800\text{ cm}^{-1}$ , com uma resolução de  $16\text{ cm}^{-1}$  e 64 *scans*, realizando pelo menos 5 réplicas de cada amostra. Para efeito de comparação, os espectros de Ac e Rc foram posteriormente convertidos para o formato JCAMP-DX e realizou-se uma análise de componentes principais (PCA), através do programa Cats desenvolvido por Barros (1999) no Institut National Agronomique Paris-Grignon, em colaboração com a Universidade de Aveiro. Foi apenas considerada a região dos espectros de FT-IR de  $1200$ - $800\text{ cm}^{-1}$ , tendo sido pré-processados (centrado e reduzido por linhas, bem como centrado por colunas).

### 2.3.3 Análise de açúcares neutros

As amostras foram submetidas a uma hidrólise, procedendo-se depois a uma redução e acetilação, obtendo assim acetatos de alditol, sendo possível quantificá-los através de um cromatógrafo em fase gasosa (Perkin Elmer – Clarus 400) com um detetor por ionização de chama (GC-FID) [50,51]. Na metodologia da hidrólise, começou-se por pesar cerca de 1,5 mg de amostra para um tubo de cultura, adicionando de seguida 200  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (Fischer Chemicals) a 72 %, incubando à temperatura ambiente durante 3 horas. Para a determinação da glucose não celulósica, as 3 horas de incubação não foram realizadas. Posteriormente, adicionou-se água destilada e a solução foi colocada num bloco de aquecimento a  $120^\circ\text{C}$ , durante 1 hora. Posteriormente, na redução e acetilação, adicionou-se

200 µL de padrão interno (2-desoxiglucose, Sigma-Aldrich, 7 mg/mL) a cada tubo, transferiram-se 0,5 mL de solução para novos tubos e esta foi neutralizada de seguida com 200 µL de NH<sub>3</sub> (Sigma-Aldrich) a 25 %. Esta foi reduzida adicionando-se 100 µL de NaBH<sub>4</sub> (Sigma-Aldrich, 15 % (m/v) em NH<sub>3</sub> 3M), sendo colocada de seguida num banho a 30 °C, durante 1 hora. Após arrefecimento, adicionou-se 300 µL de ácido acético glacial (Carlo Erba Reagents), de modo a eliminar o excesso de BH<sub>4</sub><sup>-</sup>. De seguida, foram transferidos 300 µL para tubos SOVIREL, procedendo-se com a adição de 450 µL de 1-metilimidazol (Sigma-Aldrich) e 3 mL de anidrido acético (Carlo Erba Reagents). Após 30 minutos numa placa de aquecimento a 30 °C, adicionaram-se 3,0 mL de água destilada e 2,5 mL de diclorometano (Honeywell). De modo a ocorrer a mistura e posterior separação de duas fases, agitou-se a solução e esta foi centrifugada durante cerca de 30 segundos, a 3000 rpm. Adicionaram-se as mesmas quantidades de diclorometano e água destilada, e a solução foi agitada e centrifugada nas mesmas condições. Adicionaram-se então 3 mL de água destilada e a solução foi agitada e centrifugada, com posterior remoção da fase aquosa por sucção, repetindo-se este passo três vezes. Por fim, a fase orgânica foi evaporada, recorrendo-se a um *speedvac*.

A análise dos acetatos de alditol foi realizada através de um aparelho GC-FID, usando uma coluna capilar DB-225 (30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro e 0,15 µm de espessura). A amostra foi dissolvida em 50 µL de acetona anidra e foram injetados 2 µL no equipamento. Definiu-se a temperatura no injetor para 220 °C e no detetor para 230 °C. No software definiu-se que o tempo total de análise seria de 9 minutos, com uma temperatura inicial de 200 °C. A primeira rampa de temperatura correspondeu a um aumento de 40 °C por minuto até aos 220 °C, permanecendo nesta temperatura durante 7 minutos. A segunda rampa de temperatura teve um aumento de 20 °C por minuto até aos 230 °C, permanecendo nesta temperatura durante 1 minuto. Através desta análise foi possível obter o cromatograma com o tipo de monossacarídeos detetados, bem como a sua concentração em cada amostra.

#### **2.3.4 Análise elementar**

A análise elementar das amostras foi realizada utilizando o analisador elementar Truspec 630-200-200. Cerca de 2 mg de amostra foram pesados, em duplicado, e posteriormente analisados, sendo introduzidas automaticamente as amostras na câmara de combustão. Através de processos de pirólise, as amostras foram decompostas nos seus



elementos (carbono, hidrogénio, azoto e enxofre), para o estado gasoso. Neste caso, o aparelho foi configurado de modo a que a temperatura da câmara de combustão fosse 1075° C e a temperatura do *afterburner* de 850° C. Após a atomização das amostras, onde carbono é convertido em CO<sub>2</sub>, hidrogénio em H<sub>2</sub>O, azoto em N<sub>2</sub> e enxofre em SO<sub>2</sub>, as moléculas resultantes passaram por um conjunto de detetores. O carbono, o hidrogénio e o enxofre foram detetados a partir da absorção de infravermelhos, e o azoto foi detetado a partir de condutividade térmica. A quantidade de cada elemento na amostra analisada foi obtida sob a forma de percentagem. Recorrendo aos valores de azoto a percentagem de proteína presente nas amostras foi estimada através da equação 1[52]:

$$\% \text{ Proteína} = \% \text{ Azoto} * 6,25 \quad (\text{Equação 1})$$

## 2.4 Preparação de filmes à base de amido

Os filmes à base de Ac foram preparados através da técnica de evaporação de solvente [53,54]. Dada a limitação imposta pela COVID-19 não foi possível desenvolver formulações à base de Rc. Preparou-se uma dispersão de 4% (m/V) de Ac em 100 mL de água destilada, contendo 30% (m/m, em relação à massa seca de amido) de glicerol, num kitasato. A mistura foi agitada durante 60 segundos, e colocada num banho de aquecimento a 95 °C, a 400 rpm, durante 30 minutos. Posteriormente, após a gelatinização, desgaseificou-se a dispersão e foram colocadas 21 g da mistura em placas de acrílico (12 cm x 12 cm). As placas foram colocadas numa estufa com circulação de ar, a 25 °C, *overnight*. Os filmes resultantes foram retirados das placas e armazenados numa câmara de humidade controlada através de uma solução saturada de nitrato de magnésio ( $\approx$  52%) durante pelo menos 7 dias até posterior caracterização. De modo a identificar o efeito de concentração de Ac nas propriedades mecânicas e físico-químicas dos filmes, neste trabalho também foram desenvolvidos filmes com apenas 3% (m/v) de Ac na sua formulação, mantendo todas as restantes condições do procedimento. Para efeitos de comparação foram utilizados filmes à base de Ab, sendo utilizado 4% deste na formulação.

## 2.5 Caracterização mecânica e físico-química dos filmes

### 2.5.1 Propriedades óticas

A cor dos filmes foi determinada utilizando um colorímetro (Konica Minolta, CR-400 Chroma Meter), através da medição dos parâmetros CIELAB. Em cada medição foram obtidos valores de luminosidade ( $L^*$ ), bem como as coordenadas cromáticas vermelho/verde ( $a^*$ ) e amarelo/azul ( $b^*$ ). A diferença total de cor ( $\Delta E$ ) entre os filmes Ac foi calculada em relação aos filmes Ab, através da equação 2:

$$\Delta E = \sqrt{(L^*_{Ac} - L^*_{Ab})^2 + (a^*_{Ac} - a^*_{Ab})^2 + (b^*_{Ac} - b^*_{Ab})^2} \quad (\text{Equação 2}),$$

em que  $L^*_{Ac}$ ,  $a^*_{Ac}$  e  $b^*_{Ac}$  são os parâmetros de luminosidade  $L^*$  e coordenadas cromáticas  $a^*$  e  $b^*$  do filme Ac, respetivamente, pelo que  $L^*_{Ab}$ ,  $a^*_{Ab}$  e  $b^*_{Ab}$  correspondem aos parâmetros de luminosidade  $L^*$  e coordenadas cromáticas  $a^*$  e  $b^*$  do filme Ab. Para cada filme foram realizadas 7 medições em locais distintos de cada amostra.

### 2.5.2 Molhabilidade

A molhabilidade da superfície dos filmes foi obtida utilizando um aparelho de medição do ângulo de contacto (OCA 20, Dataphysics), recorrendo também a um sistema de captura de imagens (Dataphysics SCA20 M4). Na superfície de cada tira de filme (6 cm x 1 cm) foi colocada uma gota de 3  $\mu$ L de água ultrapura, registando-se a morfologia da gota e medindo-se o ângulo de contacto que estabeleceu entre a superfície de cada amostra. Dado a diferente topografia entre cada superfície dos filmes, o ângulo de contacto foi analisado tanto na superfície “Top”, ou seja, que fica em contacto com o ar durante a evaporação do solvente, como na superfície “Bottom”, que fica em contacto com a placa durante a evaporação do solvente. Uma superfície pode ser considerada hidrofóbica quando o ângulo de contacto medido sobre a mesma é superior a 90° [55]. No total foram analisadas 6 tiras por cada filme, colocando-se cerca de 8 gotas por tira.

### 2.5.3 Propriedades mecânicas

Os testes das propriedades mecânicas foram realizados à temperatura ambiente, utilizando um texturómetro (modelo TA.Hdi, Stable Micro Systems) equipado com garras fixas. Os filmes foram cortados em tiras (9 cm x 1 cm), tendo estas sido colocadas nas garras

do aparelho. A distância inicial entre as duas garras foi de 50 mm, pelo que a distensão entre as garras ocorria a uma velocidade de 0,5 mm/s. Foram testadas entre 6 e 8 tiras para cada filme. Através das curvas de tensão-deformação foram determinados os parâmetros de Módulo de Young, alongação na rutura e resistência à tração. Estes parâmetros foram calculados através das equações 3 – 5:

$$\text{Módulo de Young} = \frac{\sigma}{\varepsilon} = \frac{F}{A} * \frac{l}{\Delta l} \quad (\text{Equação 3})$$

$$\% \text{ Elongação na rutura} = \frac{\Delta l}{l} \quad (\text{Equação 4})$$

$$\text{Resistência à tração} = \frac{F_{max}}{A} \quad (\text{Equação 5})$$

onde  $\sigma$  corresponde ao stress, que pode ser obtido através da razão entre a força ( $F$ ) e a área da tira de filme ( $A$ );  $\varepsilon$  corresponde à alongação, que pode ser calculada dividindo o valor de variação de comprimento do filme ( $\Delta l$ ) pelo comprimento inicial do mesmo ( $l$ ). A alongação na rutura calcula-se através do valor de  $\Delta l$  medido no momento da rutura do filme. O valor de  $F_{max}$ , no cálculo da resistência à tração, corresponde à força máxima medida até ao momento em que o filme quebra.

## 2.6 Análise estatística

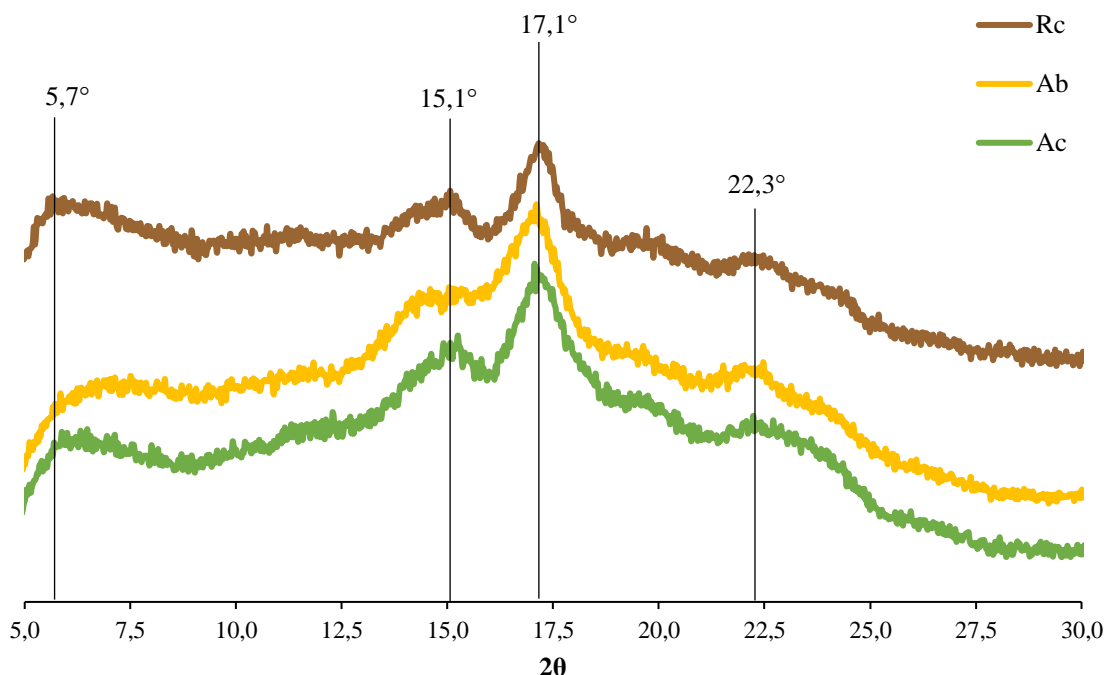
A caracterização das frações e dos filmes foi realizada obtendo triplicados de cada amostra, salvo indicação em contrário, sendo os valores expressos sob a forma de média aritmética  $\pm$  desvio padrão. A análise estatística foi realizada através do software *Excel* (Microsoft Office 365), utilizando o teste  $t$  para detetar diferenças significativas entre amostras. As diferenças foram consideradas estatisticamente diferentes se  $p < 0,05$ .

### **3. Apresentação e discussão dos resultados**

#### **3.1 Extração e caracterização das frações obtidas do caroço de abacate**

O processo utilizado para a extração de amido do caroço de abacate permitiu obter, com um rendimento médio de 13,5% da massa total, um precipitado branco (Ac) com granulometria inferior a 90  $\mu\text{m}$ , que foi separada da fração do caroço retida no peneiro (Rc).

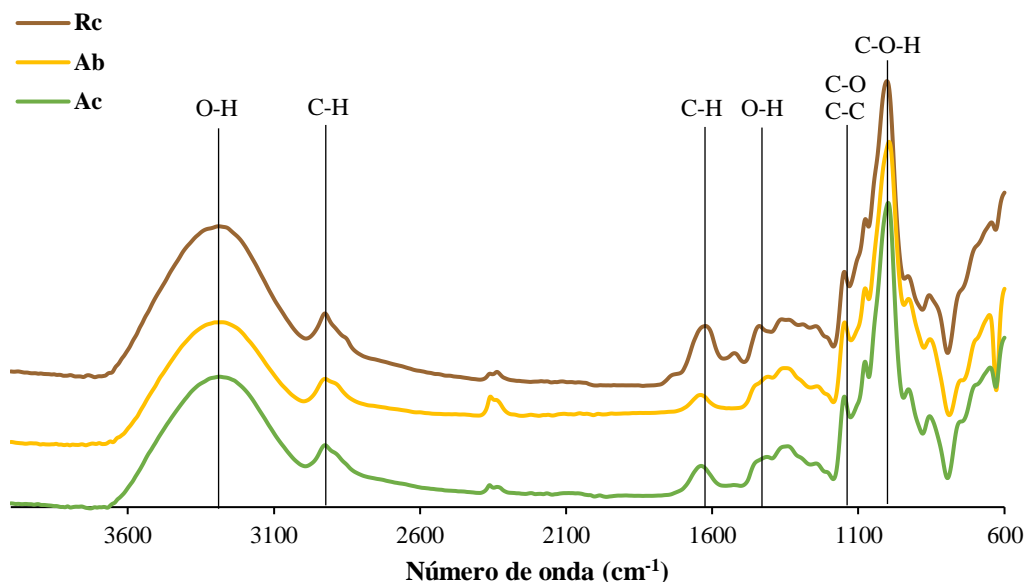
As frações Ac e Rc foram caracterizadas relativamente ao seu perfil de cristalinidade (**Figura 13**). Os difratogramas obtidos para as frações Ac e Rc do caroço de abacate permitiram observar a presença de picos em  $2\theta = 5,7^\circ$ ,  $15,1^\circ$ ,  $17,1^\circ$  e  $22,3^\circ$ , revelando um padrão de cristalinidade de acordo com o reportado para amido de caroço de abacate [56]. Um perfil semelhante foi obtido a partir de uma amostra de amido de batata recuperado a partir dos fragmentos de batata presente em lamas de lavagem de batata (Ab). Os picos de reflexão mencionados são característicos de estruturas cristalinas de amido do tipo B [57], comuns em amido obtido a partir de tubérculos, como a batata [58]. No entanto, existem picos característicos de amido que não estão presentes, localizados em  $10,0^\circ$ ,  $19,8^\circ$ ,  $23,9^\circ$  e  $26,3^\circ$ . As diferenças entre difractogramas destas amostras e os descritos na literatura para o amido podem dever-se às condições de operação usadas para a obtenção dos difractogramas, nomeadamente as condições de humidade das amostras [59]. De facto, a utilização de amido em pó com baixo teor de humidade leva a um alargamento dos picos de cristalinidade, o que pode ter ocorrido nas amostras analisadas, atendendo a que estiveram acondicionadas num exsiccador contendo sílica-gel.



**Figura 13** - Difratogramas das amostras de amido de caroço de abacate (Ac), resíduo do caroço de abacate (Rc) e amido de batata (Ab).

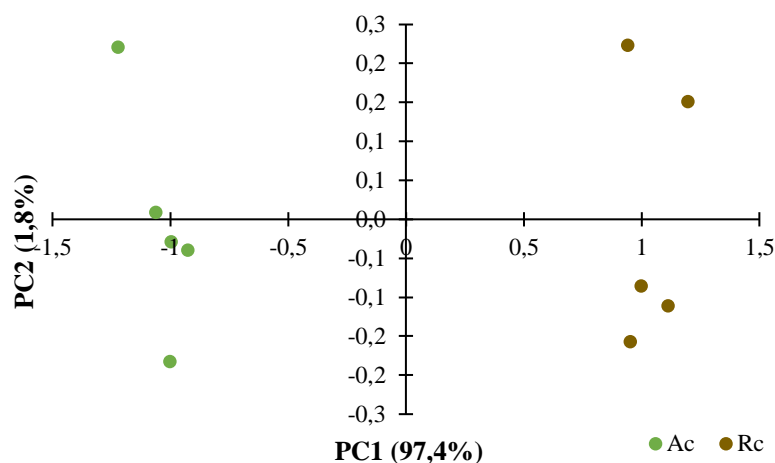
As interações moleculares entre os grânulos de amido das amostras Ac, bem como no resíduo Rc, foram avaliadas recorrendo a espectroscopia de FT-IR. Na **Figura 14** podemos observar o pico entre 3000-3700  $\text{cm}^{-1}$ , característico do estiramento entre moléculas O-H, que revela a existência de humidade nas amostras, correspondente à humidade da sala (na ordem dos 30%), e à presença destas moléculas ligadas nos monómeros de glucose das amostras. Estão também presentes os picos característicos de amido entre 2900–2950  $\text{cm}^{-1}$  (estiramento C-H), entre 1600–1650  $\text{cm}^{-1}$  (*bending* O-H) e entre 1400–1450  $\text{cm}^{-1}$  (*bending* O-H). A zona de *fingerprint*, localizada entre 800–1200  $\text{cm}^{-1}$ , contém uma elevada sobreposição de picos, dada a quantidade e complexidade as amostras, no entanto, o conjunto de picos destas amostras é semelhante ao reportado na literatura para outras amostras de amido [60]. No entanto, podem ser distinguidos alguns sinais, mais concretamente entre 1100–1200  $\text{cm}^{-1}$  (estiramento C-O, C-C) e 1050–1100  $\text{cm}^{-1}$  (*bending* C-O-H). Foi também reportado, que o tamanho do pico presente entre 975–1050  $\text{cm}^{-1}$  é sensível ao grau de cristalização da amostra [60,61], o que revela a existência de uma elevada quantidade de estruturas cristalinas de amido, comparativamente com estruturas amorfas. A cristalinidade

das amostras deve-se à formação de estruturas em dupla hélice pelas cadeias ramificadas de amilopectina, presentes em maior quantidade relativamente às cadeias de amilose que, devido à sua reduzida ramificação, são amorfas. O mesmo se verificou para a amostra de amido de batata.

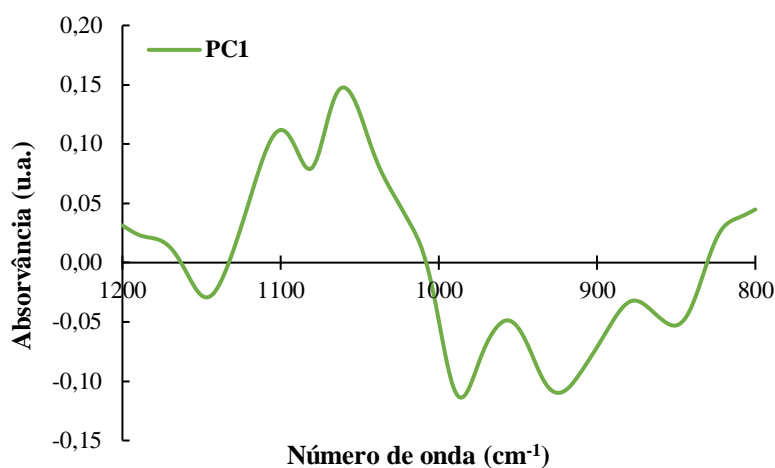


**Figura 14** - Espectros de FTIR das amostras de amido de caroço de abacate (Ac), resíduo do caroço de abacate (Rc) e amido de batata (Ab).

A análise de componentes principais (PCA) dos espectros FT-IR das frações do caroço de abacate (Ac e Rc) mostrou uma variabilidade de 97,4% no PC1, com as amostras Ac distribuídas no eixo negativo e as amostras Rc posicionadas no eixo positivo (**Figura 15**), revelando diferenças na composição das amostras. Esta diferença deve-se à presença das bandas de absorção a 1060 e 1110  $\text{cm}^{-1}$  (PC1 positivo, **Figura 16**), que podem estar associadas à presença de celulose na amostra Rc, tal como descrito na literatura [62].



**Figura 15** - Gráfico das pontuações da análise PCA (PC1 vs. PC2) dos espectros de FT-IR das amostras Ac e Rc, na região de comprimentos de onda 1200-800  $\text{cm}^{-1}$ .

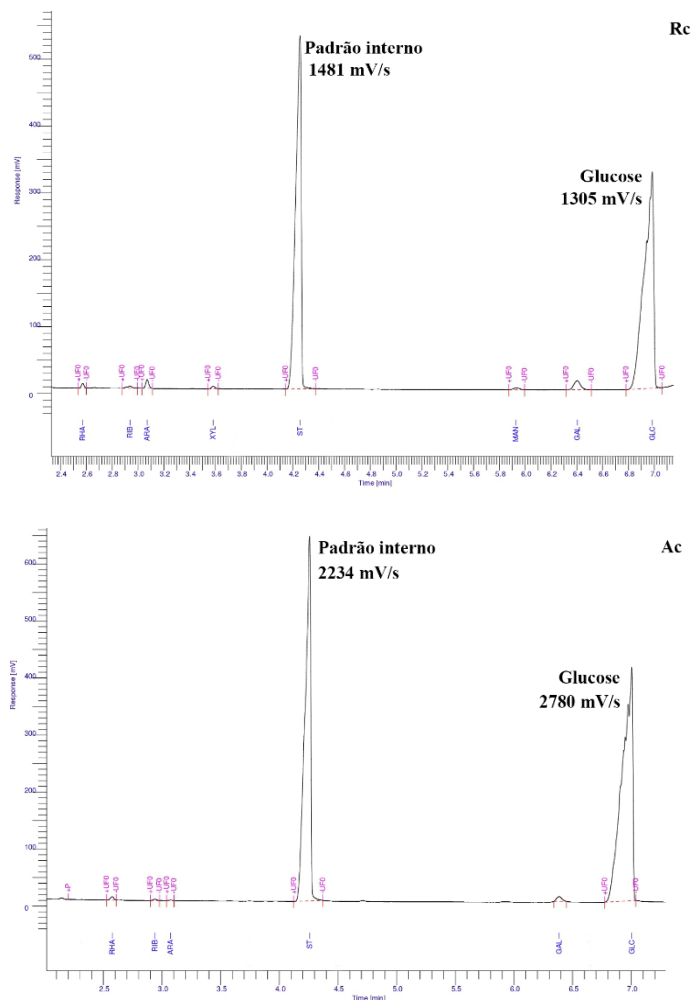


**Figura 16** - Gráfico dos carregamentos da análise PCA (PC1 e PC2) dos espectros FT-IR das amostras Ac e Rc, na região dos números de onda 1200-800  $\text{cm}^{-1}$ .

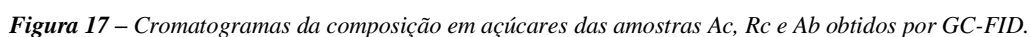
As frações foram também sujeitas à análise de açúcares neutros, com e sem pré-hidrólise, permitindo estimar a quantidade de celulose presente na amostra. Os cromatogramas obtidos (**Figura 17**) permitiram verificar que a fração Ac e a fração Rc eram ambas compostas essencialmente por glucose, tal como a amostra de amido da batata (Ab). Como a quantidade de glucose foi semelhante na análise com e sem pré-hidrólise, foi possível inferir que a quantidade de celulose presente na fração Rc é relativamente pequena, corroborando com a literatura [22]. Os resultados de análise de açúcares, juntamente com os

espectros de FT-IR obtidos mostram que as amostras Ac e Rc são ambas constituídas por amido, com uma composição semelhante à do amido de batata recuperado a partir dos subprodutos.

A predominância de amido na fração Rc revela que existe a possibilidade de extrair mais amido dos caroços de abacate. O rendimento de extração de amido de 13,5%, comparativamente com 19,66% e 20,13%, valores reportados em extrações de amido a partir do caroço de abacate [3], corroboram esta possibilidade. Assim, será necessária uma adaptação futura ao método de extração de amido dos caroços de abacate, permitindo o aproveitamento de uma maior fração do caroço de abacate.







**Tabela 5** – Percentagem de C, H, S, N e proteína nas amostras Ab, Ac e Rc, e percentagem de proteína estimada.

Amostra	%C	%H	%S	%N	Conteúdo de proteína (%)
Ac	38,9	6,09	0,00	0,085	0,531
Rc	39,5	5,70	0,00	0,414	2,588
Ab	39,6	6,13	0,00	0,003	0,019

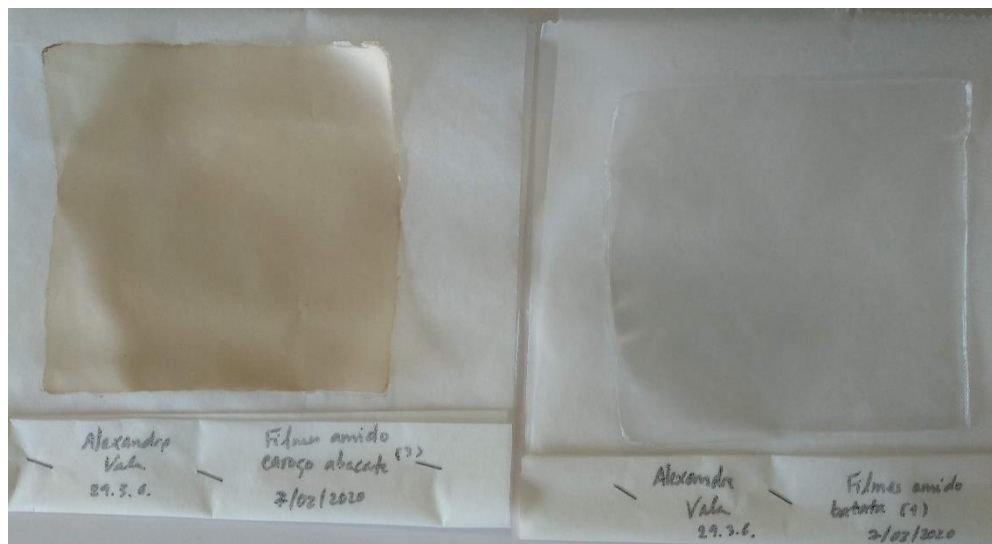
31

rica em polissacarídeos no resíduo do caroço de abacate, com potencial para serem também aproveitados na formulação de filmes à base de amido.

## 3.2 Caracterização dos filmes à base de amido do caroço de abacate

### 3.2.1 Propriedades óticas

A cor dos bioplásticos é um parâmetro importante para a futura aplicação destes nas diversas indústrias onde pode ser utilizado. Assim, após a produção dos filmes à base de amido do caroço de abacate e do amido dos fragmentos de batata, estes foram submetidos a testes de propriedades óticas, de modo a entender o efeito da utilização dos amidos com diferentes origens na cor dos filmes. Na **Figura 18** estão presentes os filmes obtidos a partir de amido de caroço de abacate e de amido de batata, podendo-se detetar macroscopicamente diferenças cromáticas entre os filmes, sendo os filmes à base de amido de caroço de abacate mais acastanhados do que os filmes à base de amido de batata, que são praticamente transparentes.



**Figura 18** - Filme à base do amido de caroço de abacate (imagem à esquerda) e filme de amido de batata (imagem à direita).

A diferença de cor observada foi então quantificada, recorrendo a um colorímetro, de modo a obter resultados no espaço de cores CIELAB. Na **Tabela 6** encontram-se os dados

de luminosidade ( $L^*$ ), coordenadas cromáticas verde-vermelho ( $a^*$ ), coordenadas cromáticas azul-amarelo ( $b^*$ ) e diferença de cor ( $\Delta E$ ) entre os filmes à base de amido de caroço de abacate e à base de amido de batata:

**Tabela 6** - Valores de luminosidade ( $L^*$ ), coordenadas cromáticas  $a^*$  e  $b^*$  e diferença de cor ( $\Delta E$ ) entre os filmes à base de amido de caroço de abacate e de fragmentos de batata

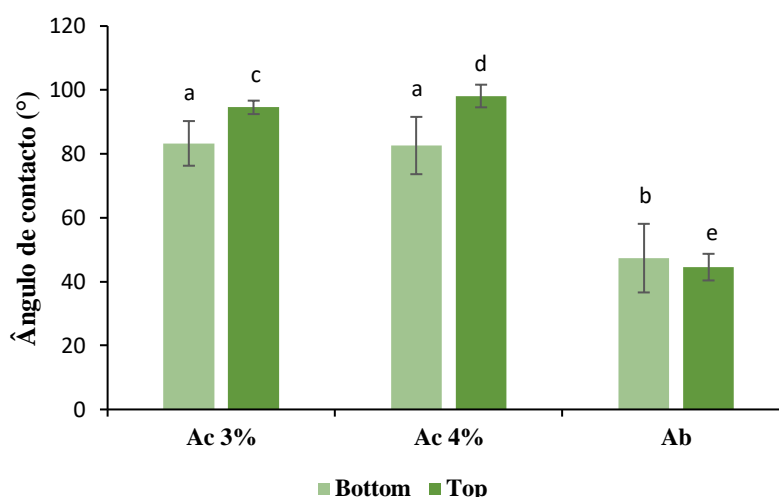
Filme	$L^*$	$a^*$	$b^*$	$\Delta E$
Batata	$93,3 \pm 0,7^a$	$1,8 \pm 0,04^c$	$-3,6 \pm 0,1^e$	
Caroço abacate	$82,4 \pm 0,7^b$	$2,7 \pm 0,1^d$	$14,6 \pm 1,3^f$	21,2

Tal como observado macroscopicamente, os parâmetros cromáticos revelaram que existe uma diferença de cor entre os filmes à base de amido de caroço de abacate e os filmes à base de amido de batata. Os resultados cromáticos dos filmes à base de amido de caroço de abacate mostraram semelhanças de cor nas coordenadas cromáticas verde-vermelho ( $a^*$ ), em que ambas as amostras se encontraram no centro do referencial, tendo ambos os filmes uma cor com menor intensidade. No entanto, relativamente às coordenadas cromáticas azul-amarelo ( $b^*$ ), os filmes à base de amido de caroço de abacate apresentaram uma tonalidade mais perto da cor amarela, comparativamente com os filmes à base de amido de batata, que mais uma vez tiveram a sua coordenada perto da origem do referencial. O amido de batata é normalmente utilizado como matéria-prima para a produção de bioplásticos devido à sua transparência, sendo assim semelhantes a plásticos derivados de combustíveis fósseis. Assim, comparativamente com os filmes à base de amido de batata obtidos, a utilização de amido do caroço de abacate levou a que os filmes obtidos a partir destes tivessem uma luminosidade mais reduzida, sendo, portanto, um pouco mais escuros. O cálculo da diferença de cor, em que se calcula a distância no espaço de cores entre o filme à base de amido de caroço de abacate e o filme à base de amido de batata, confirmaram os resultados obtidos. Esta diferença de cor entre os filmes à base de amido do caroço de abacate e os filmes à base de amido de batata deveu-se provavelmente à oxidação de compostos fenólicos existentes no caroço de abacate, como o tirosol, ácido clorogénico e catequina [17,28]. No processo de extração de amido, estes poderão ter ficado na fração líquida, juntamente com o amido, estando assim presentes na formulação dos filmes à base de amido do caroço de abacate,

oxidando e polimerizando nos pigmentos escuros correspondentes devido a reações de acastanhamento.

### 3.2.2 Molhabilidade

A análise da molhabilidade dos filmes foi realizada através da medição do ângulo de contacto de uma gota de água colocada na superfície dos filmes (**Figura 19**). Quanto maior este ângulo de contacto, maior será a hidrofobicidade da superfície onde a gota de água incide. Como foram obtidos filmes à base de amido de caroço de abacate com concentrações variadas (3 e 4%) também foi estudado o efeito da variação de concentração na hidrofobicidade dos filmes.



**Figura 19** - Gráfico com os valores de ângulo de contacto das superfícies "Bottom" e "Top" dos filmes à base de amido de batata (Ab) e à base de amido do caroço de abacate (Ac), sendo neste último preparado filmes com 3% e 4% de amido.

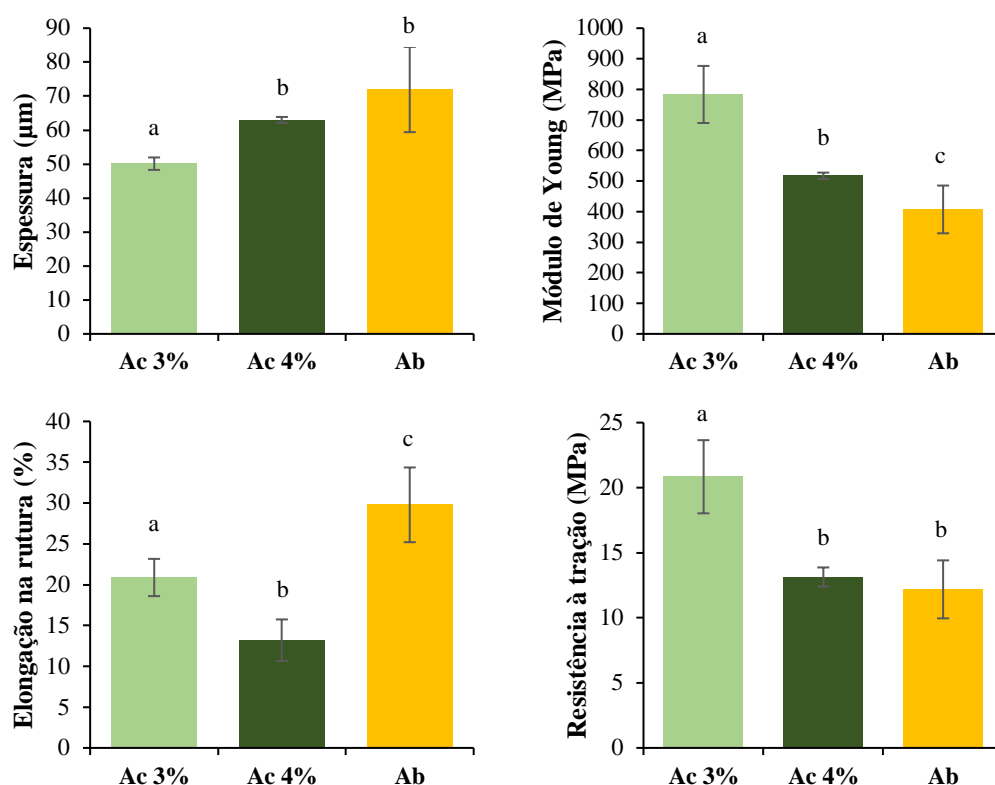
Através dos dados de molhabilidade foi possível verificar diferenças nos valores de ângulo de contacto entre os filmes à base de amido de caroço de abacate e os filmes à base de amido de batata. Os filmes com 4% de amido do caroço de abacate apresentaram valores de ângulo de contacto de 82,6 ° na face do filme em contacto com a placa (*Bottom*) e 98,1 ° na face em contacto com o ar (*Top*) durante a etapa de evaporação do solvente. Comparativamente com estes resultados, os filmes à base de amido de batata apresentaram um ângulo de contacto mais baixo em ambas as faces, mais concretamente 47,4 ° na face *Bottom* e de 44,5 ° na face *Top*. Foram também obtidos filmes com 3% de amido de caroço

de abacate, verificando que a diminuição da concentração de amido na formulação dos filmes apenas trouxe uma ligeira descida do ângulo de contacto na face *Bottom* do filme.

Assim sendo, dado que o caroço de abacate é uma matéria-prima pouco explorada para a recuperação de amido, esta análise revelou que o amido obtido a partir do caroço de abacate origina filmes mais hidrofóbicos, comparativamente aos filmes à base do amido de batata. O amido do caroço de abacate é também versátil, conferindo valores de ângulo de contacto semelhantes mesmo alterando a sua concentração na formulação de bioplásticos. Tendo em conta o acastanhamento que ocorre nos filmes à base de amido de caroço de abacate, o aumento da hidrofobicidade destes filmes pode estar relacionado com fenómenos de oxidação de compostos fenólicos que poderão estar presentes, originando pigmentos ou outros compostos hidrofóbicos. A ocorrência de interações moleculares entre estes compostos fenólicos e as cadeias de amido podem influenciar a hidrofobicidade dos filmes, limitando ligações entre os grupos hidroxilo das cadeias de amido e a água, tendo este fenómeno sido reportado em filmes de amido enriquecidos com subprodutos contendo compostos fenólicos [64,65]. Para validar estas hipóteses serão necessários estudos futuros sobre o efeito da concentração de amido do caroço de abacate na molhabilidade dos filmes, bem como quais os compostos responsáveis por este efeito.

### **3.2.3 Propriedades mecânicas**

Na **Figura 20** estão representados os valores de espessura, módulo de Young, alongação na rutura e resistência à tração dos filmes.



**Figura 20** - Representação gráfica dos valores de espessura, módulo de Young, elongação na rutura e resistência à tração de filmes à base de de amido do caroço do abacate (Ac), com concentração de 3% e 4%, e à base de amido dos fragmentos de batata (Ab).

O módulo de Young, que relaciona a elasticidade de um material em condições lineares de tensão-deformação, foi mais elevado nos filmes Ac do que nos filmes Ab, especialmente nos filmes com 3% de concentração de Ac. No caso da elongação na rutura, parâmetro diretamente relacionado com a esticabilidade dos filmes, a amostra Ac teve uma menor elongação do que as amostras Ab, sendo o filme com 4% de concentração de Ac o que teve uma menor elongação na rutura. Os resultados de resistência à tração, que indicam a tensão máxima suportada pelos filmes no teste de distensão, mostraram resultados semelhantes de resistência mecânica nos filmes 4% de Ac e nos filmes de Ab. No entanto, a resistência à tração foi superior na amostra com concentração de 3% de Ac. Através destes resultados podemos verificar que a utilização de diferentes matérias-primas para a obtenção de amido altera as propriedades mecânicas dos filmes obtidos. Os filmes à base de Ac revelaram ter uma rigidez (módulo de Young), e resistência mecânica semelhante ou até superior aos filmes à base de Ab, sendo, portanto, menos flexíveis. Assim, o amido Ac pode conter na sua matriz agentes de reforço, que promovem a formação de ligações entre as cadeias de

amido, tornando os filmes mais rígidos. De acordo com a literatura, o amido extraído a partir do caroço de abacate contém entre 15% a 35% de amilose [3,66], enquanto que o amido de batata, com cerca de 20% de amilose [67]. Esta diferença de proporções entre amilose e, consequentemente, amilopectina nos amidos utilizados poderão também ser responsáveis pela diferença nas propriedades mecânicas observada nos filmes analisados. Por fim, os resultados mostram que a utilização de diferentes concentrações de amido também resultaram numa variação das propriedades mecânicas dos filmes. Os filmes com apenas 3% de Ac não só tiveram uma maior resistência à tração e rigidez, como também apresentam uma maior flexibilidade.

#### 4. Conclusões e perspectivas futuras

A dissertação apresentada mostra que o caroço de abacate é um resíduo alimentar que pode ser valorizado e aproveitado para a produção de bioplásticos. O amido do caroço de abacate é facilmente extraído por hidratação, trituração e peneiração. Recolhendo a fração com granulometria inferior a  $0,150\ \mu\text{m}$  obtém-se uma fração purificada em amido, representando 13,5% do caroço. A caracterização química do amido do caroço de abacate revelou a sua semelhança ao amido de batata, com uma cristalinidade semelhante. O amido do caroço de abacate origina filmes mais rígidos e com uma maior resistência à tração, sendo também menos flexíveis do que os filmes de amido de batata. No entanto, a variação na concentração de amido do caroço de abacate mitiga esta perda de flexibilidade, sem alteração da sua rigidez e resistência mecânica. Os filmes à base de amido do caroço de abacate são mais acastanhados, comparativamente aos filmes à base de amido de batata, havendo diferenças nos valores das coordenadas cromáticas  $a^*$  e  $b^*$  e na luminosidade ( $L^*$ ) dos filmes. Relativamente à molhabilidade, os filmes à base de amido do caroço de abacate apresentam uma maior hidrofobicidade relativamente aos filmes à base de amido de batata, apresentando assim características mais competitivas com as dos plásticos à base de petróleo. A presença de compostos fenólicos poderá explicar tanto a diferença de cor, como a maior hidrofobicidade evidenciadas nos filmes à base de amido do caroço de abacate. Assim sendo, a utilização de amido do caroço de abacate na produção de bioplásticos revela-se uma estratégia adequada para desenvolver materiais rígidos ou flexíveis, dependendo da quantidade adicionada, e com tolerância à humidade, valorizando, assim, este subproduto descartado pela indústria alimentar.

Com o intuito de completar o trabalho descrito nesta dissertação poder-se-á, num futuro próximo, explorar as seguintes abordagens:

1. O aproveitamento da totalidade do caroço de abacate para o desenvolvimento de filmes. A utilização total do caroço de abacate na produção de filmes seria ideal, na medida em que não haveria qualquer descarte deste resíduo. Assim, não só seria necessária uma extração mais eficiente do amido do caroço de abacate, conseguindo extrair a totalidade do amido, obtendo um resíduo que poderia ser utilizado para modular o desempenho mecânico e físico-químico dos filmes à base de amido do caroço de abacate. Para isso, também seria necessária uma



caracterização físico-química mais detalhada ao resíduo sólido resultante da extração de amido do caroço de abacate.

2. A confirmação da presença de compostos fenólicos, bem como o seu efeito nas propriedades físico-químicas dos filmes à base de amido. Para o efeito seria necessária a quantificação dos compostos fenólicos nas frações obtidas. Assim, seria não só possível estudar o seu efeito nas propriedades dos filmes, como também seria possível manipular o processo do acastanhamento durante a produção destes, na tentativa de obter filmes mais hidrofóbicos e com propriedades físicas semelhantes aos plásticos à base de petróleo.
3. O estudo de novas formulações de filmes à base de amido, utilizando concentrações variáveis de amido de batata e de amido do caroço de abacate na mesma formulação. A comparação das propriedades de amido do caroço de abacate com o amido dos fragmentos de batata realizada nesta dissertação poderia ser utilizada para o estudo de novas formulações, na tentativa de obter filmes com novas características físico-químicas, potenciando os seus aspetos positivos e mitigando as suas fragilidades.
4. O desenvolvimento de formulações adaptadas ao processo de extrusão. Para processar as formulações a uma escala industrial seria necessário adaptá-las ao processo de extrusão, otimizando os parâmetros de extrusão, como o rácio das frações amido do caroço de abacate/amido de batata/ glicerol, temperatura, tempo e rotação.

## 5. Referências

1. Guthrie, J.F.; Derby, B.M.; Levy, A.S. What People Know and Do Not Know About Nutrition. 243–280.
2. Dreher, M.L.; Davenport, A.J. Hass Avocado Composition and Potential Health Effects. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2013**, *53*, 738–750.
3. Chel-Guerrero, L.; Barbosa-Martín, E.; Martínez-Antonio, A.; González-Mondragón, E.; Betancur-Ancona, D. Some physicochemical and rheological properties of starch isolated from avocado seeds. *Int. J. Biol. Macromol.* **2016**, *86*, 302–308.
4. Bergh, B.; Ellstrand, N. Taxonomy of the Avocado. *Calif. Avocado Soc. Yearb.* **1986**, *70*, 135–146.
5. Wolstenholme, B.N.; Wilely, ; A W ECOPHYSIOLOGY OF THE AVOCADO (*Persea americana* Mill.) TREE AS A BASIS FOR PRE-HARVEST MANAGEMENT. *Rev. Chapingo Ser. Hortic.* **1999**, *5*, 77–88.
6. Yahia, E.M.; Woolf, A.B. *Avocado ( Persea americana Mill.)*; Woodhead Publishing Limited, 2011;
7. Nations, F. and A.O. of the U. FAOSTAT statistical database.
8. Lusa Microclima e aumento da procura fazem produção de abacate disparar no Algarve 2019.
9. Morton, J.F. *Fruits of Warm Climates*; 2019; ISBN 0961018410.
10. Araújo, R.G.; Rodriguez-Jasso, R.M.; Ruiz, H.A.; Pintado, M.M.E.; Aguilar, C.N. Avocado by-products: Nutritional and functional properties. *Trends Food Sci. Technol.* **2018**, *80*, 51–60.
11. Cowan, A.K.; Wolstenholme, B.N. Avocado. *Encycl. Food Heal.* **2015**, 294–300.
12. Revised, S. *Composition of Foods Raw, Processed, Prepared USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 26*; 2013;
13. Thomson, C.; Bloch, A.S.; Hasler, C.M.; Kubena, K.; Earl, R.; Heins, J. Position of the American Dietetic Association: Functional foods. *J. Am. Diet. Assoc.* 1999, *99*, 1278–1285.
14. Duester, K.C. Avocado fruit is a rich source of beta-sitosterol. *J. Am. Diet. Assoc.* 2001, *101*, 404–405.
15. WHO Guideline: Potassium intake for adults and children. *World Heal. Organ.* **2012**.

16. Pareek, S.; Kitinoja, L.; Kaushik, R.A.; Paliwa, R. *Postharvest physiology and storage of ber*; 2009; Vol. 5; ISBN 9780813811420.
17. López-Cobo, A.; Gómez-Caravaca, A.M.; Pasini, F.; Caboni, M.F.; Segura-Carretero, A.; Fernández-Gutiérrez, A. HPLC-DAD-ESI-QTOF-MS and HPLC-FLD-MS as valuable tools for the determination of phenolic and other polar compounds in the edible part and by-products of avocado. *LWT - Food Sci. Technol.* **2016**, *73*, 505–513.
18. Wang, W.; Bostic, T.R.; Gu, L. Antioxidant capacities , procyanidins and pigments in avocados of different strains and cultivars. *Food Chem.* **2010**, *122*, 1193–1198.
19. González-Fernández, J.J.; Galea, Z.; Álvarez, J.M.; Hormaza, J.I.; López, R. Evaluation of composition and performance of composts derived from guacamole production residues. *J. Environ. Manage.* **2015**, *147*, 132–139.
20. Dalle, C.; Santos, M.; Pagno, C.H.; Maria, T.; Costa, H.; Faccin, L.; Hickmann, S.; Nilo, S. Biobased polymer films from avocado oil extraction residue : Production and characterization. **2016**, *43957*, 1–9.
21. Perea-Moreno, A.J.; Aguilera-Ureña, M.J.; Manzano-Agugliaro, F. Fuel properties of avocado stone. *Fuel* **2016**, *186*, 358–364.
22. Dávila, J.A.; Rosenberg, M.; Castro, E.; Cardona, C.A. A model biorefinery for avocado (*Persea americana* mill.) processing. *Bioresour. Technol.* **2017**, *243*, 17–29.
23. Bressani, R.; Rodas, B.; Ruiz, A.S. " La Composición Química , Capacidad Antioxidativa y Valor Nutritivo de la Semilla de Variedades de Aguacate ". *CONCYT-Secretaría Nac. Cienc. y Tecnol.* **2009**, 1–61.
24. Rivera-González, G.; Amaya-Guerra, C.A.; de la Rosa-Millán, J. Physicochemical characterisation and in vitro Starch digestion of Avocado Seed Flour (*Persea americana* V. Hass) and its starch and fibrous fractions. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2019**, *54*, 2447–2457.
25. Vinha, A.F.; Moreira, J.; Barreira, S.V.P. Physicochemical Parameters, Phytochemical Composition and Antioxidant Activity of the Algarvian Avocado (*Persea americana* Mill.). *J. Agric. Sci.* **2013**, *5*.
26. Gómez, F.S.; Peirósánchez, S.; Iradi, M.G.G.; Azman, N.A.M.; Almajano, M.P. Avocado seeds: Extraction optimization and possible use as antioxidant in food. *Antioxidants* **2014**, *3*, 439–454.
27. Rodríguez-carpena, J.G.; Morcuende, D.; Estévez, M. Avocado by-products as

- inhibitors of color deterioration and lipid and protein oxidation in raw porcine patties subjected to chilled storage. *MESC* **2011**, 89, 166–173.
28. Kosińska, A.; Karamać, M.; Estrella, I.; Hernández, T.; Bartolomé, B.; Dykes, G.A. Phenolic compound profiles and antioxidant capacity of persea americana mill. peels and seeds of two varieties. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, 60, 4613–4619.
  29. Kahn, V. Polyphenol oxidase activity and browning of three avocado varieties. *J. Sci. Food Agric.* **1975**, 26, 1319–1324.
  30. Dabas, D.; Elias, R.J.; Lambert, J.D.; Ziegler, G.R. A Colored Avocado Seed Extract as a Potential Natural Colorant. **2011**, 76, 1335–1341.
  31. KAHN, V. Some Biochemical Properties of Polyphenoloxidase From Two Avocado Varieties Differing in Their Browning Rates. *J. Food Sci.* **1977**, 42, 38–43.
  32. PARK, H.J.; WELLER, C.L.; VERGANO, P.J.; TESTIN, R.F. Permeability and Mechanical Properties of Cellulose-Based Edible Films. *J. Food Sci.* **1993**, 58, 1361–1364.
  33. Versino, F.; García, M.A. Cassava (*Manihot esculenta*) starch films reinforced with natural fibrous filler. *Ind. Crops Prod.* **2014**, 58, 305–314.
  34. González-Seligra, P.; Guz, L.; Ochoa-Yepes, O.; Goyanes, S.; Famá, L. Influence of extrusion process conditions on starch film morphology. *Lwt* **2017**, 84, 520–528.
  35. Martin, C.; Smith, A.M. Starch biosynthesis. *Plant Cell* **1995**, 7, 971–985.
  36. Liu, H.; Xie, F.; Yu, L.; Chen, L.; Li, L. Thermal processing of starch-based polymers. *Prog. Polym. Sci.* **2009**, 34, 1348–1368.
  37. Curá, J.A.; Jansson, P. -E; Krisman, C.R. Amylose is not Strictly Linear. *Starch - Stärke* **1995**, 47, 207–209.
  38. Olkku, J.; Rha, C.K. Gelatinisation of starch and wheat flour starch-A review. *Food Chem.* **1978**, 3, 293–317.
  39. Eliasson, A.-C. Viscoelastic behaviour during the gelatinization of starch. *Texture Stud.* **1986**, 17, 253–265.
  40. Albertsson, A. -C; Karlsson, S. Degradable polymers for the future. *Acta Polym.* **1995**, 46, 114–123.
  41. Vieira, M.G.A.; Da Silva, M.A.; Dos Santos, L.O.; Beppu, M.M. Natural-based plasticizers and biopolymer films: A review. *Eur. Polym. J.* **2011**, 47, 254–263.
  42. Gutiérrez, T.J.; Alvarez, V.A. Cellulosic materials as natural fillers in starch-

- containing matrix-based films: a review. *Polym. Bull.* **2017**, *74*, 2401–2430.
43. Garcia, M.A.; Martino, M.N.; Zaritzky, N.E. Lipid Addition to Improve Barrier Properties of Edible Starch-based Films and Coatings. *J. Food Sci.* **2000**, *65*, 941–944.
  44. Bertuzzi, M.A.; Castro Vidaurre, E.F.; Armada, M.; Gottifredi, J.C. Water vapor permeability of edible starch based films. *J. Food Eng.* **2007**, *80*, 972–978.
  45. Souza, A.C.; Goto, G.E.O.; Mainardi, J.A.; Coelho, A.C.V.; Tadini, C.C. Cassava starch composite films incorporated with cinnamon essential oil: Antimicrobial activity, microstructure, mechanical and barrier properties. *LWT - Food Sci. Technol.* **2013**, *54*, 346–352.
  46. Fakhouri, F.M.; Costa, D.; Yamashita, F.; Martelli, S.M.; Jesus, R.C.; Alganer, K.; Collares-Queiroz, F.P.; Innocentini-Mei, L.H. Comparative study of processing methods for starch/gelatin films. *Carbohydr. Polym.* **2013**, *95*, 681–689.
  47. Moscicki, L.; Mitrus, M.; Wojtowicz, A.; Oniszczyk, T.; Rejak, A. Extrusion-Cooking of Starch.
  48. Silva, I.R.A.; Magnani, M.; de Albuquerque, F.S.M.; Batista, K.S.; Aquino, J. de S.; Queiroga-Neto, V. Characterization of the chemical and structural properties of native and acetylated starches from avocado (*Persea americana* Mill.) seeds. *Int. J. Food Prop.* **2017**, *20*, S279–S289.
  49. Barros, A.; Rutledge, D. Principal Component Transform 2008.
  50. Coimbra, M.A.; Delgadillo, I.; Waldron, K.W.; Selvendran, R.R. Isolation and Analysis of Cell Wall Polymers from Olive Pulp. In *Plant Cell Wall Analysis*; Linskens, H.F., Jackson, J.F., Eds.; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 1996; pp. 19–44 ISBN 978-3-642-60989-3.
  51. Selvendran, R.R.; March, J.F.; Ring, S.G. Determination of aldoses and uronic acid content of vegetable fiber. *Anal. Biochem.* **1979**, *96*, 282–292.
  52. FAO FAO Food and Nutrition paper 77. Food energy - methods of analysis and conversion factors. **2003**.
  53. Zavareze, E.D.R.; Pinto, V.Z.; Klein, B.; El Halal, S.L.M.; Elias, M.C.; Prentice-Hernández, C.; Dias, A.R.G. Development of oxidised and heat-moisture treated potato starch film. *Food Chem.* **2012**, *132*, 344–350.
  54. Shen, X.L.; Wu, J.M.; Chen, Y.; Zhao, G. Antimicrobial and physical properties of

- sweet potato starch films incorporated with potassium sorbate or chitosan. *Food Hydrocoll.* **2010**, *24*, 285–290.
55. Law, K.Y. Definitions for hydrophilicity, hydrophobicity, and superhydrophobicity: Getting the basics right. *J. Phys. Chem. Lett.* **2014**, *5*, 686–688.
  56. KAHN, V. Characterization of Starch Isolated from Avocado Seeds. *J. Food Sci.* **1987**, *52*, 1646–1648.
  57. Frost, K.; Kaminski, D.; Kirwan, G.; Lascaris, E.; Shanks, R. Crystallinity and structure of starch using wide angle X-ray scattering. *Carbohydr. Polym.* **2009**, *78*, 543–548.
  58. Lopez-Rubio, A.; Flanagan, B.M.; Gilbert, E.P.; Gidley, M.J. A novel approach for calculating starch crystallinity and its correlation with double helix content: A combined XRD and NMR study. *Biopolymers* **2008**, *89*, 761–768.
  59. Nara, S.; Mori, A.; Komiya, T. Study on Relative Crystallinity of Moist Potato Starch. *Starch - Stärke* **1978**, *30*, 111–114.
  60. Warren, F.J.; Gidley, M.J.; Flanagan, B.M. Infrared spectroscopy as a tool to characterise starch ordered structure - A joint FTIR-ATR, NMR, XRD and DSC study. *Carbohydr. Polym.* **2016**, *139*, 35–42.
  61. Castillo, L.A.; López, O. V.; García, M.A.; Barbosa, S.E.; Villar, M.A. Crystalline morphology of thermoplastic starch/talc nanocomposites induced by thermal processing. *Heliyon* **2019**, *5*.
  62. Oliveira, H.; Barros, A.S.; Delgadillo, I.; Coimbra, M.A.; Santos, C. Effects of fungus inoculation and salt stress on physiology and biochemistry of in vitro grapevines: Emphasis on sugar composition changes by FT-IR analyses. *Environ. Exp. Bot.* **2009**, *65*, 1–10.
  63. Pal, S.; Mal, D.; Singh, R.P. Cationic starch: An effective flocculating agent. *Carbohydr. Polym.* **2005**, *59*, 417–423.
  64. Ghasemlou, M.; Aliheidari, N.; Fahmi, R.; Shojaei-Aliabadi, S.; Keshavarz, B.; Cran, M.J.; Khaksar, R. Physical, mechanical and barrier properties of corn starch films incorporated with plant essential oils. *Carbohydr. Polym.* **2013**, *98*, 1117–1126.
  65. Luchese, C.L.; Uranga, J.; Spada, J.C.; Tessaro, I.C.; de la Caba, K. Valorisation of blueberry waste and use of compression to manufacture sustainable starch films with enhanced properties. *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, *115*, 955–960.

66. Builders, P.F.; Nnurum, A.; Mbah, C.C.; Attama, A.A.; Manek, R. The physicochemical and binder properties of starch from *Persea americana* Miller (Lauraceae). *Starch/Staerke* **2010**, *62*, 309–320.
67. Talja, R.A.; Peura, M.; Serimaa, R.; Jouppila, K. Effect of amylose content on physical and mechanical properties of potato-starch-based edible films. *Biomacromolecules* **2008**, *9*, 658–663.